

# **Il rischio biologico nel settore della bonifica dei siti contaminati**

## **Pubblicazione realizzata da**

### **INAIL**

Settore Ricerca, Certificazione e Verifica  
Dipartimento Processi Organizzativi  
U.F. Comunicazione - Redazione

### **AUTORI**

Biancamaria Pietrangeli e Domenico Davolos *INAIL - Settore Ricerca, Certificazione e Verifica  
Dipartimento Installazioni di Produzione e Insedimenti Antropici*

### **COLLABORAZIONE REDAZIONALE**

Maria Castriotta  
Tiziana Belli

### **CONTATTI**

**INAIL** - Settore Ricerca, Certificazione e Verifica  
Dipartimento Installazioni di Produzione e Insedimenti Antropici  
Via Urbana, 167 | 00184 Roma  
b.pietrangeli@inail.it  
**www.inail.it**

© 2013 INAIL

La pubblicazione viene distribuita gratuitamente e ne è quindi vietata la vendita nonché la riproduzione con qualsiasi mezzo.  
È consentita solo la citazione con l'indicazione della fonte.

ISBN 978-88-7484-299-5

Tipolitografia INAIL - Milano, maggio 2013

## Presentazione

Il problema dell'inquinamento dei suoli e delle falde acquifere da parte dei contaminanti organici di svariata natura chimica (idrocarburi, sostanze organo-alogenate, fitofarmaci, derivati dell'anilina, naftoli, pesticidi, etc.) è particolarmente rilevante in numerose zone dell'Italia e molto spesso è aggravato dalla elevata persistenza e tossicità di questi composti con i connessi rischi sanitari.

Il nuovo contesto legislativo in materia di bonifica di siti contaminati ha avuto importanti ricadute nel settore tecnologico: da interventi drastici, spesso molto costosi, che di fatto non fanno che trasferire gli inquinanti da una matrice ad un'altra, la domanda di bonifica si sta spostando verso tecnologie, come quelle biologiche, più naturali e meno costose, mirate al ripristino effettivo dei siti con maggiori garanzie di eco-compatibilità.

Questa attività industriale ha necessariamente risvolti anche in termini di sicurezza occupazionale e si ritiene fondamentale che l'INAIL dia indirizzi in materia di prevenzione, valutazione e gestione dei rischi lavorativi.

La monografia tratta il rischio biologico occupazionale nelle attività di bonifica che è un rischio spesso sottovalutato o per nulla considerato e fornisce indicazioni in materia di valutazione e controllo dei rischi biologici durante le diverse fasi operative.



# Indice

<b>Introduzione</b>	7
<b>1. Il rischio biologico: infettivo, allergico e tossico</b>	8
<b>2. Identificazione dei pericoli biologici durante le attività di bonifica</b>	10
<b>3. Tecnologie di bonifica biologica dei siti contaminati</b>	16
<b>4. Individuazione dei pericoli biologici durante le operazioni di bonifica</b>	20
<b>5. L'impiego di MOGM nella <i>bioremediation</i></b>	30
<b>6. Valutazione del rischio biologico connesso alle operazioni di bonifica</b>	30
<b>7. Le relazioni dose-effetto degli agenti biologici</b>	31
<b>8. La casistica epidemiologica a supporto della valutazione del rischio</b>	32
<b>9. Il monitoraggio microbiologico ambientale</b>	34
<b>10. La gestione del rischio biologico durante le attività di bonifica</b>	36
<b>11. La sorveglianza sanitaria dei lavoratori del settore bonifiche</b>	38
<b>Riferimenti bibliografici</b>	40



## Introduzione

Dall'analisi della letteratura tecnico-scientifica in materia di rischi per la salute e la sicurezza dei lavoratori del settore bonifiche dei siti contaminati si evince che il rischio biologico occupazionale è spesso sottovalutato o per nulla considerato [1]. In base a quanto disposto dal Titolo X del D.Lgs. 81/2008 [2] i rischi biologici per i lavoratori devono essere valutati al pari degli altri rischi per la salute e la sicurezza al fine di definirne le corrette modalità di gestione e controllo alla luce di quelle che sono le più aggiornate conoscenze scientifiche in materia.

Durante le operazioni di bonifica dei siti contaminati l'esposizione del lavoratore ad agenti biologici può essere sia potenziale che deliberata in funzione delle lavorazioni che si svolgono per il recupero del sito.

Il campo di applicazione del Titolo X comprende, infatti, tutte le attività che possono comportare rischio di esposizione ad agenti biologici, sia quelle che prevedono un uso deliberato di microrganismi che le attività a rischio potenziale di esposizione. Nello specifico si determina uso o impiego di agenti biologici allorché microrganismi, considerati agenti biologici ai sensi dell'art. 267, vengano deliberatamente introdotti nel ciclo lavorativo, per esservi trattati, manipolati o trasformati. Nel caso di altre attività, come quelle riportate nell'allegato XLIV del D.Lgs. 81/2008 [2], ancorché possa determinarsi la presenza di agenti biologici anche molto pericolosi, non si concreta un vero e proprio uso di tali agenti, mancando il deliberato intento di farne oggetto dell'attività lavorativa. La differente tipologia di rischio espositivo condiziona gli adempimenti che il datore di lavoro deve adottare.

Il datore di lavoro può prescindere dall'applicazione delle disposizioni di cui agli artt. 273, 274, commi 1 e 2, 275, comma 3, e 279, qualora i risultati della valutazione dimostrino che l'attuazione di tali misure non è necessaria.

In tutte le attività per le quali la valutazione del rischio evidenzia rischi per la salute dei lavoratori il datore di lavoro attua misure tecniche, organizzative e procedurali per evitare ogni esposizione degli stessi ad agenti biologici (art. 272), misure igieniche (art. 273), fornisce informazione e formazione ai lavoratori (art. 278) ed attua la sorveglianza sanitaria (art. 279).

Come per altri settori lavorativi che comportano esposizioni analoghe a quelle delle bonifiche, come quello della depurazione acque reflue e le attività agricole, è da considerarsi potenziale l'esposizione del lavoratore ai microrganismi indigeni, ossia a

quelli normalmente presenti nelle matrici contaminate, e/o loro parti (endotossine batteriche, spore fungine) e prodotti (tossine).

La stessa tipologia di rischio potenziale si configura nelle pratiche di bonifica biologica che prevedono l'aggiunta alle matrici contaminate di substrati organici di nutrimento per le flore microbiche indigene, come per esempio, ammendanti quali compost, pellets di legno, fieno, stallatico, scarti vegetali, letame e specifici accettori di elettroni, come l'ossigeno, al fine di accelerare le reazioni di biodegradazione delle sostanze chimiche. In questo caso il pericolo biologico (*biohazard*) risulta associato alle caratteristiche igienico-sanitarie del materiale organico utilizzato come ammendante. L'esposizione deliberata si ha invece quando microrganismi con specifiche attività biodegradative (inoculi selezionati) vengono intenzionalmente addizionati alla matrice da decontaminare o direttamente *in situ* o all'interno di bioreattori. In questo caso i pericoli biologici sono associati alle caratteristiche di pericolosità dei microrganismi impiegati come inoculi.

Nel D.Lgs. 81/2008 [2] gli agenti biologici sono classificati in base a specifiche caratteristiche di pericolosità sia nei confronti della salute dei lavoratori che della popolazione generale (art. 268), ovvero:

- a) l'infettività, intesa come capacità di un microrganismo di penetrare e moltiplicarsi nell'ospite;
- b) la patogenicità, riferibile alla capacità di produrre malattia a seguito di infezione;
- c) la trasmissibilità, intesa come la capacità di un microrganismo di essere trasmesso da un soggetto infetto ad un soggetto suscettibile;
- d) la neutralizzabilità, intesa come la disponibilità di efficaci misure profilattiche per prevenire la malattia o terapeutiche per la sua cura.

Sulla base delle suddette caratteristiche la Direttiva 2000/54/CE [3] suddivide in classi di pericolosità i microorganismi, con valori crescenti da uno a quattro e delle quali la quarta, la più pericolosa, è riferita ai microrganismi che assommano la presenza di tutte e quattro le caratteristiche negative considerate. Tale elenco è riportato nell'Allegato XLVI del D.Lgs. 81/2008 [2].

## 1. Il rischio biologico: infettivo, allergico e tossico

Una condizione di pericolo biologico (infettivo, allergico o tossico) si può configurare in ogni procedura che disperda nell'ambiente microorganismi e/o loro parti e prodotti, ma la presenza di una situazione pericolosa non costituisce di per sé una condizione di rischio fino a che non sia stata verificata l'esistenza di un'esposizione all'agente pericoloso causa del rischio e valutata l'entità di tale esposizione [4].

È necessario inoltre ricordare che infezione non è sinonimo di malattia infettiva; solo se l'agente supera le difese dell'organismo si manifestano tutti i sintomi caratteristici che evidenziano lo stato morbosità e quindi il danno. Il rischio consiste, quindi, nella

probabilità che, nelle condizioni espositive identificate, il lavoratore possa subire un danno alla salute.

La valutazione del rischio biologico risulta però seriamente compromessa dalla mancanza di valori limite di esposizione (Occupational Exposure Levels, OELs) agli agenti biologici che possano essere da riferimento nella interpretazione delle dosi espositive in termini di frequenza attesa delle diverse manifestazioni patologiche a carico del lavoratore, siano esse di natura infettiva che allergica o tossica [4].

La maggior parte dei microrganismi fonte di rischio espositivo nelle operazioni di bonifica dei siti contaminati appartengono alle classi di rischio 1 e 2 e sono per lo più patogeni opportunisti, ossia microrganismi ambientali o saprofiti in grado di determinare uno stato di malattia solo in presenza di una diminuzione delle difese immunitarie dell'individuo esposto.

Per esposizione ad agenti biologici appartenenti a classi di rischio a limitata patogenicità la stima del rischio può essere effettuata prevalentemente in termini epidemiologici cioè osservando, al seguito di una certa esposizione (presunta o misurata), l'incidenza nella popolazione lavorativa di eventi morbosi minori che possano essere utilizzati quali indicatori degli effetti patogeni conseguenti all'eventuale infezione [4].

Il sistema di sorveglianza epidemiologica dei lavoratori deve necessariamente contemplare il rischio biologico di tipo allergico, come dimostrato dalla casistica epidemiologica di settori affini a quello delle bonifiche, come quello dell'edilizia, dell'agricoltura e del trattamento delle acque reflue. È infatti verosimile che tra i lavoratori del settore siano prevalenti manifestazioni patologiche specifiche quali le sindromi da polveri organiche, l'irritazione della pelle, degli occhi, delle mucose del naso e delle prime vie aeree, connesse all'esposizione aerea a polveri e aerosol contenenti agenti biologici quali: spore fungine, attinomiceti, endotossine batteriche, proteine animali o vegetali, etc. [5].

La ricerca delle condizioni di ipersuscettibilità è un elemento fondamentale della sorveglianza sanitaria: possono costituire condizioni di ipersuscettibilità individuale nei confronti delle malattie infettive, eventuali fattori personali di predisposizione a contrarre affezioni da allergeni, le patologie della cute e delle mucose che ne riducono le proprietà di barriera, le flogosi in atto, i deficit immunologici congeniti ed acquisiti.

La mancanza dei valori limite di esposizione agli agenti biologici comporta che, dal punto di vista operativo per gestire in sicurezza le attività di bonifica dei siti contaminati, l'approccio più corretto è quello preventivo, ossia ridurre al più basso livello tecnicamente realizzabile l'entità dell'esposizione individuale, attraverso la definizione e l'applicazione di specifiche misure di contenimento tecniche, organizzative e procedurali e controllarne il rispetto da parte del lavoratore opportunamente informato e formato in tema di rischio biologico.

## 2. Identificazione dei pericoli biologici durante le attività di bonifica

Prima di procedere alla valutazione del rischio è necessario identificare i pericoli espositivi in funzione: 1) delle caratteristiche degli agenti biologici presenti nelle matrici ambientali contaminate; 2) delle attività che si svolgono nel sito contaminato e delle relative modalità operative in funzione dei metodi di bonifica adottati; 3) delle modalità di esposizione del lavoratore in funzione delle mansioni che egli svolge. A tale proposito è necessario ricordare le diverse vie attraverso le quali i microrganismi possono colonizzare i lavoratori esposti: la via inalatoria, attraverso la produzione di polveri o bioaerosol; la via transcutanea, attraverso ferite o altre lesioni della pelle che si possono contaminare, e la via gastroenterica, attraverso la contaminazione delle mani ed il contatto diretto con parti del corpo esposte (viso, occhi) tramite schizzi o versamento di liquidi contaminati.

Al fine di identificare i pericoli biologici devono essere quindi analizzate le diverse fasi operative delle attività di bonifica: dal sopralluogo conoscitivo, alla fase di allestimento del cantiere ed alle operazioni di bonifica vera e propria.



**Figura 1:** Operazioni pre-scavo terreno contaminato



**Figura 2:** Operazione di scavo terreno contaminato

## ***I pericoli espositivi durante il sopralluogo conoscitivo del sito***

Nella valutazione preliminare dell'area da sottoporre a bonifica si procede dapprima con il sopralluogo conoscitivo, puramente osservativo, per verificare lo stato generale del sito, individuare le sorgenti di rischio ambientale, identificare le situazioni che richiedono interventi urgenti, e, ove necessario, disporre i lavori di sgombero e pulizia [6].

Questa fase è particolarmente complessa nelle aree abbandonate da tempo, nelle quali la presenza di vegetazione incolta, di rifiuti (solidi o liquidi) abbandonati, reti fognarie prive di manutenzione, animali randagi, edifici in disuso colonizzati da volatili, rendono più difficile il riconoscimento di pericoli immediati. Non è inoltre infrequente la presenza in questi siti di occupanti abusivi, che contribuisce ad aggravare la condizione di pericolo.

Nei suoli contaminati sono presenti numerosi microrganismi patogeni opportunisti, ossia in grado di causare patologie in soggetti particolarmente suscettibili alle infezioni per condizioni fisiologiche specifiche o stato immunitario compromesso. Il *biohazard* è connesso alla esposizione ai microrganismi adsorbiti al suolo o presenti in liquami o rifiuti di altro genere presenti nel sito.

Il possibile contatto con suolo, escrementi di topi, di animali randagi e di volatili, espone il lavoratore al rischio di contrarre specifiche malattie infettive quali tetano, leptospirosi, istoplasmosi, psittacosi, criptococcosi, istoplasmosi [7].

Nel suolo è comunemente presente *Clostridium tetani*, agente eziologico del tetano, una malattia ad altissima letalità ed efficacissima profilassi, che continua a fare vittime in Italia, soprattutto tra le categorie lavorative più esposte, come quella degli agricoltori. Per le categorie professionali a rischio la vaccinazione è obbligatoria dal 1963 ed è quindi necessario il controllo del relativo stato immunitario del lavoratore [8].

La possibile presenza di microrganismi più pericolosi, appartenenti anche al gruppo di rischio 3, come *Bacillus anthracis*, è possibile nei siti sui quali insistevano allevamenti animali od industrie di lavorazione del pellame. Il microrganismo, in presenza di ossigeno, è in grado di sporificare e sotto tale forma sopravvivere nel terreno per lungo periodo, anche fino a 40 anni [9] e con la movimentazione del terreno le spore possono essere inalate dal lavoratore esposto.

La presenza di aree contaminate da escrementi di pipistrelli ed uccelli in genere può comportare l'esposizione a *Histoplasma capsulatum*, agente fungino di classe 3 causa di istoplasmosi, che avviene attraverso l'inalazione di conidi o frammenti di ife. L'infezione è per lo più asintomatica e si risolve spontaneamente, con una sintomatologia simile ad una semplice influenza; in condizione di immuno-compromissione l'infezione è altresì molto grave e può provocare lesioni distruttive del tessuto polmonare [7, 10].

In presenza di escrementi di piccioni ed altri volatili è possibile la disseminazione aerea di *Chlamidia psittaci* che viene eliminato attraverso le feci degli animali infetti. La psittacosi è una patologia dalle manifestazioni iniziali aspecifiche: febbre, brividi, cefalea, mialgie, tosse secca, con un quadro di interessamento del tratto respiratorio superiore. La malattia può altresì interessare, oltre alle vie respiratorie, altri orga-

ni quali: fegato, miocardio, cute, encefalo ed altre sedi, con possibili complicazioni o recidive [11].

Un'altra patologia ben conosciuta ed emergente tra i lavoratori del settore forestale è quella da *Cryptococcus gattii*, agente fungino patogeno opportunista ubiquitario, in grado di dare infezioni, che si possono sviluppare dopo anni dalla esposizione, anche in individui apparentemente immunocompetenti [12].

Nei terreni contaminati da feci di piccioni o nell'humus è possibile isolare l'agente fungino *Cryptococcus neoformans* che causa malattie con alto indice di gravità in soggetti immunocompromessi, benché siano documentati casi di malattie anche in soggetti sani, soprattutto se sottoposti a terapie con corticosteroidi [11, 13].

Le zone ricche di vegetazione e prati umidi rappresentano l'habitat ideale di parassiti quali le zecche che, attraverso punture accidentali, giocano un ruolo essenziale nella trasmissione di numerosi agenti infettivi, quali virus, batteri, spirochete, rickettsie e parassiti. I morsi da zecche causano una grande varietà di malattie infettive acute e croniche, comprendenti la malattia di Lyme, le febbri ricorrenti, la febbre purpurica delle Montagne Rocciose, la febbre bottonosa mediterranea, l'erlichiosi, la febbre Q, la tularemia, la babesiosi e l'encefalite virale trasmessa da zecche. Le rickettsie, batteri intracellulari parassiti obbligati, possono essere veicolati oltre che dalle zecche anche da punture di insetti quali pulci e pidocchi [14, 15].

In presenza di superfici a contatto con matrici acquose, all'interno di circuiti idraulici in disuso da tempo in edifici abbandonati, è necessario considerare come fonte di pericolo biologico la presenza di biofilm contenenti svariati microrganismi tra cui quelli appartenenti ai generi *Legionella* o *Mycobacterium* [16].

*Legionella* è un batterio di cui sono state identificate più di 50 specie, suddivise in 71 sierogruppi; quella più pericolosa, a cui sono stati collegati circa il 90% dei casi di legionellosi, è *Legionella pneumophila*. L'infezione si contrae attraverso aerosol, cioè inalando acqua in piccole goccioline (1-5  $\mu$  di diametro) contaminata da una sufficiente quantità di batteri; quando questa entra a contatto con i polmoni di soggetti a rischio insorge l'infezione che può dare luogo a due distinti quadri clinici: la febbre di Pontiac e la legionellosi. La prima si risolve in 2-5 giorni ed è accompagnata da malessere generale e cefalee seguiti da febbre. La legionellosi è invece molto più grave: oltre a malessere, cefalee e tosse, possono essere presenti sintomi gastrointestinali, neurologici e cardiaci e complicanze varie; nei casi più gravi può addirittura essere letale. Diversi Autori hanno segnalato casi di malattia in lavoratori di impianti industriali di trattamento di acque reflue [17-19].

Molto diffusi nell'ambiente terrestre e acquatico sono i micobatteri non tubercolari (NTB), un genere di bacilli Gram-positivi che comprendono diverse specie tra cui *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* [20]. Essi sono in grado di causare infezioni in soggetti affetti da patologie predisponenti, attraverso l'inalazione di aerosol, o infezioni superficiali della cute e dei tessuti molli attraverso l'inoculazione diretta. *Mycobacterium avium* complex (MAC) è responsabile della maggior parte di queste malattie ed i polmoni rappresentano il sito più comune di infezio-

ne, con casi occasionali che interessano i linfonodi, le ossa e le articolazioni, la cute e le ferite [21-24].

Nei casi di malattia polmonare in soggetti immunocompetenti è stata documentata una preesistente patologia cronico-degenerativa dell'apparato respiratorio [25, 26].

**Figura 3:** Vestizione con Dispositivi di Protezione Individuale



### ***I pericoli espositivi nella fase di allestimento del cantiere***

Durante le operazioni di allestimento del cantiere, i rischi espositivi di natura biologica sono analoghi a quelli del settore edilizio. Le operazioni di movimentazione del terreno (escavazione del sito, trivellazione, perforazioni a secco, carico e scarico terreno, etc.) comportano inevitabilmente produzione di elevati quantitativi di polvere e tale condizione è spesso ulteriormente aggravata dalla presenza costante nelle zone di lavoro di veicoli in movimento [27, 28].

Gli agenti biologici dispersi nel terreno vengono aerotrasportati dai moti convettivi dell'aria sotto forma di aerosol, adsorbendosi a polveri, particelle liquide, emulsioni oleose, polvere di legno, etc., con conseguente esposizione dei lavoratori prevalentemente attraverso le vie aeree [29]. Oltre alla via inalatoria, la contaminazione può avvenire attraverso la cute in presenza di tagli o ferite, attraverso materiali o strumenti contaminati ed il contatto diretto con parti del corpo esposte (faccia, occhi) tramite schizzi o versamento di liquidi.

Spesso la bonifica del sito prevede lo smantellamento di edifici od opere murarie con esposizione del lavoratore ad agenti fungini appartenenti al genere *Aspergillus* (*A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger*, *A. terreus*) [30-32].

Quello di *Aspergillus* è il gruppo di microfunghi più diffuso nell'ambiente: comprende molte specie che vivono nel suolo e nella vegetazione in decomposizione, su numerosi substrati, tra cui materiale da costruzione, rifiuti organici, acque inquinate da materiale organico, etc. Considerata l'ubiquitarità ambientale di *Aspergillus*, l'uomo è costantemente esposto a questo genere di funghi. Negli individui con normale funzionalità del sistema immunitario, le infezioni causate da *Aspergillus* sono relativamente rare ed inconsuete. Tuttavia, a causa del sostanziale incremento nella popolazione di individui con immuno-soppressione attiva, la contaminazione ambientale da parte di funghi è divenuta un fattore sempre più rilevante tanto che nella predisposizione dei piani di sicurezza nel settore edilizio vengono spesso previste norme specifiche per la prevenzione delle infezioni da *Aspergillus* [33]. Delle oltre 185 specie appartenenti al genere *Aspergillus*, circa 20 sono riconosciute come agenti scatenanti infezioni opportunistiche nell'uomo quali: onicomicosi, sinusiti, aspergillosi cerebrale o polmonare, meningiti, endocarditi, miocarditi, osteomieliti, otomicosi, endoftalmi ecc. Negli Stati Uniti, l'aspergillosi è la seconda causa di infezione da funghi, dopo quelle da ceppi di *Candida* spp., che richiede ospedalizzazione. Sono altresì in aumento anche segnalazioni di infezioni causate da altri ceppi di muffe e lieviti più rari [34, 35]. Tale cambiamento dell'epidemiologia delle infezioni fungine opportunistiche è da ricondurre ai cambiamenti climatici, specie per quelle specie la cui distribuzione geografica è limitata da fattori ambientali specifici [36, 37].

Oltre ad infezioni opportunistiche, i micro-funghi possono causare un'ampia gamma di disturbi respiratori tra cui irritazioni, allergie, asma, sinusiti, ben studiati negli ambienti di lavoro sia *indoor* che *outdoor* [38-41], riconducibili all'esposizione professionale alle numerose proteine di origine fungina riconosciuti come importanti allergeni [42, 43].

Intensa è l'attività di ricerca in tale settore scientifico, grazie anche alle moderne tecniche di sequenziamento del DNA che permettono lo studio completo del genoma degli agenti fungini [44-47] e dei geni che codificano per le proteine coinvolte nelle reazioni allergiche [48].

In Tabella 1 sono riportati alcuni degli agenti biologici potenzialmente presenti nelle matrici ambientali del sito contaminato, fonte di esposizione occupazionale durante i sopralluoghi del sito contaminato e l'allestimento del cantiere.

**Tabella 1:** Agenti fonte di *biohazard* nelle fasi di sopralluogo conoscitivo del sito ed allestimento del cantiere

<b>Agente biologico</b>	<b>Sorgente espositiva</b>	<b>Patologia correlata</b>
<i>Bacillus anthracis</i>	Suolo	Antrace
<i>Clostridium tetani</i>	Suolo	Tetano
<i>Cryptococcus gattii</i>	Suolo, acque	Infezioni polmonari, della pelle, dei tessuti molli, meningiti
<i>Chlamydia psittaci</i>	Suolo	Psittacosi
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Suolo, acque	Criptococcosi
Zecche, pulci, acari	Suolo	Malattia di Lyme, febbri ricorrenti, rickettsiosi, tularemia, encefalite
<i>Legionella</i> spp.	Acque	Febbre di Pontiac, legionellosi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acque	Infezioni dell'apparato respiratorio, dermatiti, infezioni ai tessuti molli, infezioni sistemiche
Micobatteri non tubercolari (NTB)	Acque, suolo	Infezioni polmonari, dei linfonodi, delle ossa, della cute
<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. Terreus</i> , etc.	Suolo	Disturbi respiratori tra cui irritazioni, allergie, asma, infezioni opportunistiche (onicomicosi, sinusiti, otomicosi, meningiti, endocarditi), aspergilloso cerebrale e polmonare.
<i>Actinomycetales</i> ( <i>Actinomyces</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , etc. <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> , <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> )	Suolo	Nocardiosi, ascessi polmonari, encefalici o cutanei. Alveoliti allergiche estrinseche
<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Enterococcus</i>	Sedimenti portuali, Acque di falda	Varie manifestazioni infettive, sistemiche o intestinali
Polveri organiche contenenti endotossine batteriche, spore fungine, attinomiceti, fibre vegetali	Bioaerosol	Disturbi oculari, eritemi cutanei, mal di testa, riniti, sinusiti, asma, alveoliti allergiche estrinseche

### 3. Tecnologie di bonifica biologica dei siti contaminati

Prima di entrare in dettaglio dell'esposizione professionale durante le operazioni di bonifica per via biologica dei siti contaminati, è opportuno descrivere brevemente le diverse tecnologie biologiche attualmente applicabili al fine di esaminare le condizioni operative che possono comportare specifici rischi espositivi di natura biologica.

La biodegradazione avviene naturalmente in ogni terreno contaminato da inquinanti organici; generalmente però non si hanno le condizioni ambientali ottimali perché essa risulti efficace, in tempi ragionevoli. Nei trattamenti biologici si provvede pertanto ad ottimizzare tali condizioni, operando in sistemi *ex situ* oppure direttamente *in situ*.

Le tecniche di *bioremediation* sono tipicamente più economiche rispetto ad altri metodi come l'incenerimento, il lavaggio del suolo o il suo deposito in discariche ed offrono il vantaggio di poter trattare molti contaminanti direttamente *on-site*, riducendo i rischi espositivi di natura chimica per il personale operativo, o i rischi di una potenziale esposizione più vasta nell'eventualità di un incidente durante il trasporto. La *bioremediation* di norma richiede input poco costosi (ad es. i nutrienti) e non genera residui che necessitino trattamenti aggiuntivi, nè stoccaggio e messa in sicurezza. Se condotta *in situ* non richiede nemmeno l'escavazione del materiale. Sebbene la *bioremediation* non sia in grado di degradare gli inquinanti inorganici, essa può essere impiegata per modificarne la valenza, causando l'adsorbimento, l'immobilizzazione, la precipitazione, l'*uptake*, l'accumulazione e la concentrazione di tali composti da parte di micro e macro organismi. Queste tecniche mostrano inoltre considerevoli margini di miglioramento nella stabilizzazione e nella rimozione dei composti inorganici dai suoli. Inoltre, dal momento che la *bioremediation* è basata sull'attenuazione naturale, risulta più accettabile da parte dell'opinione pubblica rispetto ad altre tecnologie. Infine, anche se la maggior parte dei sistemi di *bioremediation* operano in condizioni aerobiche, operando in condizioni anaerobiche, è possibile degradare alcune molecole altrimenti recalcitranti alla biodegradazione. A tutt'oggi le tecniche di *bioremediation* sono impiegate con successo per decontaminare suoli, fanghi e acque contaminate con petrolio, idrocarburi, solventi, pesticidi, conservanti e altri composti chimici organici [49].



**Figura 4:** Rimozione di terreno contaminato con autopala a cabina chiusa

## **Bioventing**

Il *bioventing* consiste nella stimolazione della biodegradazione naturale *in situ* di qualsiasi composto degradabile per via aerobica fornendo ossigeno ai microrganismi già presenti nel suolo da trattare. La tecnologia non risulta particolarmente costosa e, in particolare, in associazione con la tecnologia del *soil vapor extraction* (SVE), sta diventando sempre più comune.

## **Enhanced bioremediation**

L'*enhanced bioremediation* è rappresentato da un processo nel quale microrganismi indigeni o inoculati (ad es. funghi, batteri) metabolizzano gli inquinanti organici dispersi nel suolo o nelle acque, convertendoli in prodotti finali non pericolosi. Nutrienti, ossigeno e altri ammendanti possono essere impiegati per accrescere l'efficacia del processo o l'assorbimento degli inquinanti. In presenza di sufficiente ossigeno e nutrienti, i microrganismi convertono definitivamente numerosi inquinanti organici in anidride carbonica, acqua e massa microbica. Tipicamente il processo prevede il percolamento o l'iniezione di acqua superficiale (o pura) mescolata con nutrienti e satura di ossigeno disciolto. Talvolta possono essere aggiunti opportuni microrganismi oppure una fonte addizionale di ossigeno quale il perossido di idrogeno. In assenza di ossigeno gli inquinanti organici possono essere completamente trasformati in metano, in parte in anidride carbonica e in minima parte in idrogeno. In condizioni di solfato-riduzione, invece, il solfato si trasforma in solfito o in zolfo elementare.

L'*enhanced bioremediation* può essere applicata anche alla decontaminazione delle acque: in questo caso l'incremento dell'ossigeno può essere ottenuto insufflando aria al di sotto della superficie dell'acqua o facendo circolare perossido di idrogeno attraverso la zona di acque sotterranee contaminate. Analoga funzione possono svolgere composti di perossido in fase solida. In condizioni di microaerofilia, come nelle acque di falda, è possibile fornire alla flore microbiche autoctone, accettori di elettroni alternativi all'ossigeno, come per esempio i nitrati che vengono fatti circolare nell'acqua contaminata al fine di incrementare il tasso di degradazione dei contaminanti organici ad opera dei batteri denitrificanti.

## **Bioattenuation (attenuazione naturale controllata)**

I processi naturali sub-superficiali quali la diluizione, la volatilizzazione, la biodegradazione, l'adsorbimento possono essere impiegate per ridurre a livelli accettabili le concentrazioni di inquinanti. La *natural attenuation* presenta il vantaggio di una minore produzione e quindi trasferimento di scarti della bonifica ed è meno invasiva, necessitando soltanto di poche strutture superficiali e può essere impiegata in com-

binazione con o come *follow-up* di altre tecnologie (attive) di bonifica, con costi complessivi inferiori rispetto a quelli delle tecnologie attive. Può essere inoltre applicata per la bonifica da alcuni metalli, in particolare nei casi in cui il processo conduca ad un cambiamento nella valenza del metallo che porti all'immobilizzazione (ad es. il cromo). I tempi di degradazione naturale sono comunque molto più lenti di quella attiva. Inoltre col tempo le condizioni ideologiche e geochimiche del sito possono variare, influenzando l'efficacia complessiva del processo.

## **Biopile**

Il sistema delle biopile rappresenta una tecnologia di trattamento a breve termine, semplice e poco costosa: l'attività operativa e la manutenzione possono infatti richiedere da poche settimane a qualche mese.

Il terreno contaminato viene disposto in cumuli nei quali vengono ottimizzati tutti i parametri fisici (T, pH, potenziale redox) e nutrizionali (macro e micronutrienti, fattori di crescita). L'installazione di un sistema di aspersione di liquidi sulla superficie della pila, con lo scopo di rifornire le biomasse microbiche di elementi nutritivi necessari al mantenimento delle attività fisiologiche ed enzimatiche, permette anche l'inoculo di starter microbici (batterici e fungini). La localizzazione delle pile avviene generalmente sotto tettoie e/o teloni che le proteggono dall'azione meteorica di dilavamento. È inoltre previsto un sistema di aerazione e un sistema per il recupero del percolato.

La composizione della pila prevede la miscelazione di strati alternati di terreno contaminato e materiali organici quali paglia e stallatico al fine di favorire le reazioni esotermiche finalizzate alla creazione di un gradiente termico variabile da 30 a 45°C. L'innalzamento termico favorisce le reazioni di termodistruzione quando, per la presenza di materiali particolarmente fermentescibili, si arrivano ad ottenere livelli termici superiori a 60-75°C.

## **Compostaggio**

Il compostaggio è un processo biologico controllato nel quale il suolo contaminato viene scavato e mescolato con agenti addensanti e ammendanti organici quali pellets di legno, fieno, stallatico o scarti vegetali. Un'adeguata selezione degli ammendanti assicura un'adeguata porosità e un bilanciamento di carbonio e azoto idonei a promuovere l'attività microbica. Il compostaggio, oltre che in pile statiche areate, può avvenire in contenitori agitati meccanicamente o con rimescolamento periodico. Deve comunque essere previsto un controllo delle sostanze organiche volatili o semivolatili (VOC e SVOC) mediante apparecchiature apposite. Dà inoltre origine ad un aumento nel volume del materiale da trattare a causa dell'aggiunta degli ammendanti

## **Landfarming**

Il *landfarming* consiste nella lavorazione del terreno con mezzi agricoli che permettono la distribuzione degli strati di terreno contaminato al di sopra di un letto drenante e di un manto impermeabile. Tali strati vengono quindi irrigati con acqua, arricchita di ossigeno, nutrienti ed eventualmente inoculi microbici. Si tratta di una tecnologia di bio-bonifica a medio-lungo termine, ormai completamente sviluppata, che normalmente include qualche accorgimento per evitare il percolamento degli inquinanti, e che richiede l'escavazione del suolo e il suo spostamento. Le condizioni del suolo devono essere periodicamente monitorate per garantire la massima efficienza del procedimento. Alcune condizioni che influenzano il processo sono pressochè incontrollabili (temperatura, piogge) e possono allungare notevolmente i tempi necessari. Deve inoltre essere rigoroso il controllo delle polveri, soprattutto durante le fasi di movimentazione dei materiali.

## **Trattamenti biologici ex situ**

Dopo escavazione del suolo contaminato e separazione dai sassi e dal pietrisco, la frazione fine del terreno viene trattata in bioreattori contenenti acqua in percentuali variabili a seconda dell'inquinante da trattare, dalla velocità di degradazione e dalle caratteristiche fisiche del suolo. Vengono inoltre aggiunti nutrienti ed eventualmente, altri additivi e acidi o basi per il controllo del pH. Possono inoltre essere inoculati nel bioreattore ceppi microbici con specifiche capacità degradative.

L'ossigeno viene fornito mediante dei diffusori disposti sul fondo o mediante agitazione superficiale. Conclusa la degradazione dell'inquinante, la miscela viene estratta e disidratata, mentre l'acqua di processo viene ricircolata.

I bioreattori in fase *slurry* rappresentano una tecnologia a breve-medio termine, preferibile ai trattamenti *in situ* nel caso di suoli eterogenei, a bassa permeabilità, dove l'acqua sotterranea risulti difficile da captare o dove siano necessari interventi e trattamenti particolarmente rapidi. A tale scopo sono disponibili unità mobili di trattamento, che possono essere rapidamente spostate da un sito di trattamento all'altro. In considerazione delle attività sopra descritte è possibile ipotizzare alcune condizioni di *biohazard* riconducibili alle operazioni previste nelle diverse applicazioni di bonifica biologica (Tabella 2).

**Tabella 2:** Modalità espositive ad agenti biologici in rapporto alle tecnologie di bonifica biologica in funzione delle diverse fasi di lavoro

Fasi di lavoro	Vie di esposizione				Tecnologie di bonifica biologica				
	Polveri	Aereosol	Terreno /acqua	In situ	Soil washing	Land farming	Compostaggio	Biopile	Bio-reattore
Carico,scarico, trasporto, preparazione del terreno	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Classificazione, separazione terreni,etc.	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Soil washing	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Drenaggio, disidratazione suolo	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Trattamento delle acque	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Monitoraggio acque di falda da piezometri	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lavorazione del suolo con mezzi agricoli	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Compostaggio o biopila	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Allestimento di sistemi di drenaggio e di areazione	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Scavo pozzetti di prelievo	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Predisposizione di trincee per l'aggiunta di nutrienti	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arricchimenti microbici in coltura liquida	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Culture microbiche su terreni solidi	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Manipolazione di sostanze organiche liquide	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Lavorazione di sostanze organiche secche (trinciatura, compostaggio)	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Aggiunta di nutrienti mediante irrorazione	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Miscelazione del suolo con sostanze disidratate	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Allestimento biopile	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Carico/scarico bioreattori	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Manutenzione e/o pulizia	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manutenzione/sostituzione biofiltri di impianti per il trattamento dell'aria	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+) potenziale esposizione del lavoratore agli agenti biologici.

#### 4. Individuazione dei pericoli biologici durante le operazioni di bonifica

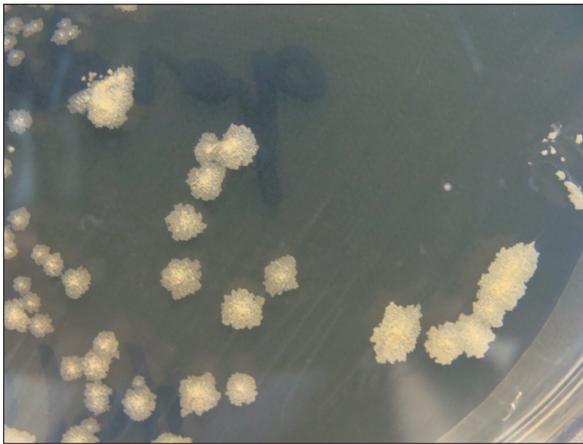
Dal punto di vista qualitativo, la flora microbica di un suolo contaminato non si differenzia sostanzialmente da quella dei suoli non contaminati, tanto che spesso i rischi biologici connessi alle attività di bonifica vengono solitamente equiparati a quelli osservati nel settore dell'agricoltura e/o o dello smaltimento delle acque reflue. Tuttavia, in dipendenza della presenza di sostanze inquinanti, possono verificarsi apprezzabili sfalsamenti quantitativi delle comunità microbiche, dal momento che

taluni *chemicals* possono esplicare azione tossica nei confronti di alcune popolazioni microbiche indigene, favorendo lo sviluppo di quelle per le quali il contaminante rappresenta un substrato di crescita, con un aumento della biomassa microbica pari a circa 1-2 potenze decimali [50].

Analogamente rientrano nelle lavorazioni a potenziale rischio espositivo di natura biologica tutti quei processi di bonifica in cui la flora microbica autoctona è stimolata ad attuare una più efficiente biodegradazione delle sostanze inquinanti attraverso la ottimizzazione dei parametri che favoriscono l'attività microbica *in situ* quali: la concentrazione di ossigeno o di altri accettori di elettroni, dei nutrienti, la temperatura, il pH ed il potenziale redox.

In presenza di contaminazione da idrocarburi, i ceppi microbici che risultano più attivi dal punto di vista biodegradativo appartengono ai generi batterici: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Marinobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Vibrio*, ai generi fungini *Aspergillus*, *Amorphoteca*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Graphium*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e tra i lieviti ai generi *Candida*, *Yarrowia*, e *Pichia* [51-54].

**Figura 5:** *Gordonia* sp. idrocarburo-ossidante

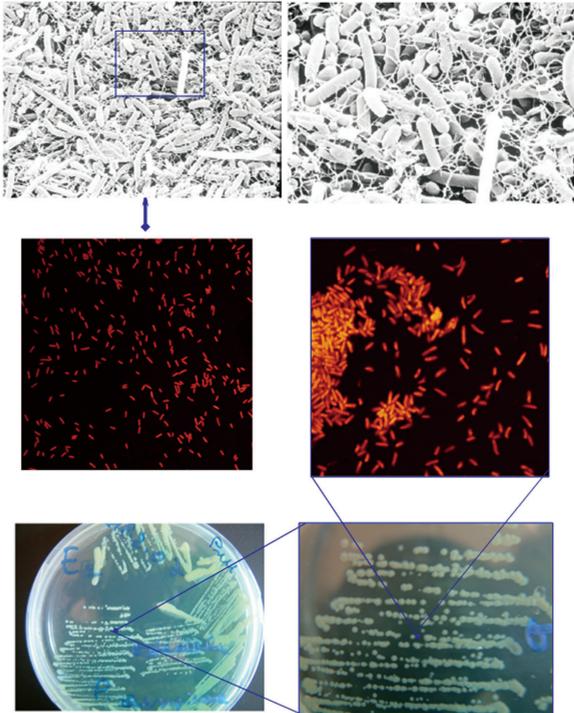


A questi generi microbici appartengono specie con stipiti occasionalmente patogeni e la loro patogenicità si estrinseca prevalentemente per contatto a seguito di infezione di ferite o per inalazione. Inoltre, nell'ambito dello stesso genere batterico possono ritrovarsi specie diverse con specifiche caratteristiche di virulenza. Particolare interesse riveste lo studio delle caratteristiche di patogenicità del genere *Actinomyceetales*, solitamente i membri più stabili delle comunità batteriche dei suoli,

che svolgono un ruolo significativo nel risanamento di suoli con contaminazioni di vecchia data. I generi batterici appartenenti all'ordine *Actinomycetales* (*Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bifobacterium*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propiobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*) sono praticamente ubiquitari nei suoli ricchi di materia organica. Il genere *Nocardia* raggruppa almeno 85 specie, molte delle quali non sono patogene per l'uomo, mentre altre (*Nocardia asteroides*) possono causare diverse malattie (nocardiosi) nell'ospite, qualora immunocompromesso. La maggior parte delle nocardiosi sono contratte per inalazione del batterio o attraverso ferite aperte con conseguente formazione di ascessi polmonari, encefalici o cutanei [55, 56]. Gli attinomiceti sono riconosciuti inoltre quali agenti causali di allergie respiratorie nell'uomo [57, 58].

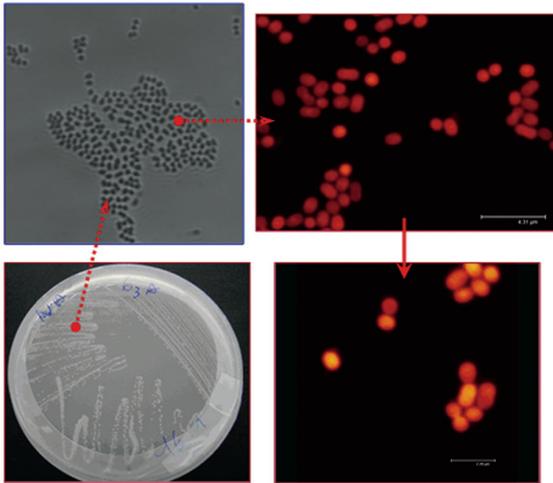
L'inalazione di grandi quantità di spore da attinomiceti termofili, tra cui *Thermoactinomyces vulgaris*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, può essere causa di alveoliti allergiche estrinseche (EAA), patologie diffuse tra gli addetti del settore agricolo (*farmer's lung*), degli impianti di compostaggio o della coltivazione di funghi [59]. Ben nota è inoltre la capacità degli attinomiceti di produrre metaboliti secondari che potrebbero rappresentare una importante sorgente di esposizione ambientale. Studi recenti dimostrano che il genere *Streptomyces* produce inibitori del proteosoma che intervengono nei meccanismi cellulari di neurodegenerazione contribuendo allo sviluppo o alla progressione di malattie come il Parkinson [60-66].

Il genere batterico prevalente tra i microrganismi del suolo e delle acque in grado di degradare gli xenobiotici è quello di *Pseudomonas*. Svariati ceppi di *Pseudomonas* possono degradare più di cento composti organici: in molti casi un singolo ceppo può degradare numerosi xenobiotici [67]. *Pseudomonas aeruginosa* rappresenta l'archetipo del patogeno opportunistico per l'uomo: il batterio non è quasi mai in grado di infettare un tessuto sano, tuttavia non esiste pressoché alcun tessuto che *P. aeruginosa* non sia in grado di infettare, se le sue difese siano state, in qualche modo, compromesse. *P. aeruginosa* provoca infezioni dell'apparato respiratorio, dermatiti, infezioni ai tessuti molli, ed una lunga serie di infezioni sistemiche particolarmente in individui affetti da immuno-soppressione [68].

**Figura 6:** Ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* idrocarburo-ossidante

Oltre a *Pseudomonas*, altri generi batterici Gram-negativi ampiamente diffusi in acque e suoli inquinati ed attivi nei processi di biodegradazione sono *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Azoarcus*. Ben noti sono per esempio i meccanismi che i batteri Gram-negativi possiedono relativamente alle loro capacità di resistere ad elevate concentrazioni di solventi [69].

Tra i batteri gram-negativi il genere *Acinetobacter* ha un ruolo fondamentale nella mineralizzazione dei composti aromatici e numerose sono le applicazioni biotecnologiche in cui *Acinetobacter* è impiegato per la rimozione di svariati inquinanti come i bifenili, bifenili clorurati, aniline, fenoli, benzoato, acetonitrile e la *bioremediation* di matrici contaminate da metalli pesanti [70]. *Acinetobacter baumannii* è un importante patogeno opportunisto che si ritrova nel suolo e nelle acque di superficie, noto per causare infezioni soprattutto in soggetti immunocompromessi, considerata anche la sua elevata antibiotico-resistenza [71]. Le principali infezioni dovute a *A.baumannii* sono le infezioni delle vie respiratorie, le batteriemie e le meningiti secondarie.

**Figura 7:** *Acinetobacter* sp. idrocarburo-ossidante

I membri del genere *Sphingomonas*, a differenza di altri Gram-negativi che solitamente presentano una specificità di substrato piuttosto ristretta, possono utilizzare una grande varietà di composti aromatici come fonti di carbonio e di energia. Grazie alle sue elevate capacità biodegradative *Sphingomonas* è ampiamente utilizzato nelle operazioni di bioremediation, ma anche nell'ambito di questo genere batterico ci sono specie, quale *Sphingomonas paucimobilis* che causa infezioni anche gravi non solo in individui immunocompromessi, ma anche sani [72, 73].

Tra i batteri gram-negativi alcune specie del genere *Burkholderia* sono abili degradatori dei pesticidi organoclorurati ed i bifenili policlorurati (PCB). Ma al genere batterico di *Burkholderia* appartengono anche specie patogene per l'uomo come *Burkholderia mallei*, responsabile della morva, *Burkholderia pseudomallei*, agente eziologico della melioidosi e *Burkholderia cepacia*, praticamente ubiquitario nelle acque e nel suolo e noto per essere patogeno opportunista [74, 75].

Come sopra esposto è ampia la versatilità metabolica e la resistenza a xenobiotici ambientali da parte dei batteri Gram-negativi e quindi elevate sono le capacità biodegradative di questo gruppo microbico. Le evidenze scientifiche riportano una prevalenza pari al 18% di batteri Gram-negativi contro il 5.4% di batteri gram-positivi in 58 campioni di acque e suoli di siti contaminati [50].

In presenza di batteri Gram-negativi una fonte rilevante di *biohazard* è quella riconducibile alla presenza di endotossine nelle polveri che si generano durante le operazioni di movimentazione del suolo. Le endotossine sono costituite dal lipopolisaccaride (LPS), presente nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi, che è costituito da una frazione polisaccaridica ed una lipidica (lipide A) [76]. Quest'ultima componente è la frazione responsabile degli effetti tossici. Sindromi respiratorie e mal funzionamento polmonare sono tra gli effetti più studiati dovuti all'esposizione da polveri organiche contenenti endotossine batteriche [77].

Nelle operazioni di bonifica di sedimenti portuali provenienti dalle operazioni di dragaggio è possibile l'esposizione del lavoratore ai tradizionali patogeni enterici appartenenti ai generi *Salmonella*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Giardia*, etc. [78]. Dati sperimentali dimostrano che le operazioni di *bioremediation* su queste matrici determinano un incremento delle popolazioni microbiche con attività biodegradative specifiche e, nel contempo, dei microrganismi fecali presenti [79].

Come emerge chiaramente da quanto sopra riportato non è possibile fare un elenco esaustivo di tutti i microrganismi presenti nelle diverse matrici ambientali di siti contaminati o applicati come inoculi specifici. È possibile riportare quelli più frequentemente isolati o impiegati nelle bonifiche, le relative classi di rischio e patogenicità ed allergenicità (Tabella 3).

Va ribadito che grazie alle moderne tecniche di sequenziamento del DNA, la letteratura si arricchisce continuamente di evidenze scientifiche di nuovi ceppi microbici con specifiche caratteristiche di biodegradazione.

**Tabella 3:** Specie microbiche più frequentemente isolate da suoli contaminati da sostanze xenobiotiche [80]

Microrganismi	Classe di rischio	Note
<b>Batteri</b>		
<i>Achromobacter</i> spp.	1/2	B
<i>Alcaligenes</i> spp.	1/2	P
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2	I,B,P
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	2	I,B,P
<i>Acinetobacter</i> spp.	1/2	I,B
<i>Actinomyces</i> spp.	1/2	B,P
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	I,P
<i>Aeromonas</i> spp.	1/2	B
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1	I,B
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	1	I
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	1	I,B
<i>Alcaligenes latus</i>	1	B
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2	I,B,P
<i>Alcaligenes xilosus</i>	2	I,B
<i>Alcaligenes</i> spp.	1/2	I,B,P
<i>Ancylobacter aquaticus</i>	1	B
<i>Arthrobacter globiformis</i>	1	I,B
<i>Arthrobacter ilicis</i>	1	I
<i>Arthrobacter</i> spp.	1	I,B
<i>Aureobacterium</i> spp.	1	B
<i>Bacillus anthracis</i>	3	P
<i>Bacillus cereus</i>	2	I,P
<i>Bacillus</i> spp.	1	I,B
<i>Beijerinckia</i> spp.	1	B

Continua

Segue: Tabella 3

<b>Microrganismi</b>	<b>Classe di rischio</b>	<b>Note</b>
<i>Brevibacterium</i> spp.	1/2	B
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	I,B
<i>Citrobacter freundii</i>	2	B,P
<i>Clostridium botulinum</i>	2	P
<i>Clostridium perfringens</i>	2	P
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	B
<i>Clostridium tetani</i>	2	P
<i>Clostridium</i> spp.	1/2	P
<i>Comamonas testosteroni</i>	1	B
<i>Corynebacterium flavescens</i>	1	I,B
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	2	I,P
<i>Corynebacterium</i> spp.	1/2	B
<i>Desulfotomaculum</i> spp.	1	B
<i>Enterococcus</i> spp.	1/2	P
<i>Erwinia</i> spp.	1	B,P
<i>Escherichia coli</i>	2	B,P
<i>Escherichia</i> spp.	1/2	P
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	2	I,P
<i>Flavobacterium</i> spp.	1/2	I,B
<i>Klebsiella</i> spp.	1/2	PB
<i>Leucothrix</i> spp.	1	B
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1	B
<i>Methanococcus mazei</i>	1	B
<i>Methanosarcina barkeri</i>	1	B
<i>Methanospirillum</i> spp.	1	B
<i>Methanotherix soehngenii</i>	1	B
<i>Micrococcus luteus</i>	1	I,P
<i>Micrococcus varians</i>	1	B
<i>Micrococcus</i> spp.	1	I,B
<i>Micromonospora</i> spp.	1	B,P
<i>Moraxella</i> spp.	1/2	B
<i>Mycobacterium aurum</i>	1	B
<i>Mycobacterium vaccae</i>	2	B
<i>Mycobacterium</i> spp.	1/2	B
<i>Myxococcus</i> spp.	1	B
<i>Nitrosomonas europaea</i>	1	B
<i>Nocardia asteroides</i>	2	I,P
<i>Nocardia farcinica</i>	2	P
<i>Nocardia</i> spp.	1/2	I,B,P
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	I,P
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	I,P
<i>Proteus</i> spp.	1/2	B,P

Continua

Segue: Tabella 3

<b>Microrganismi</b>	<b>Classe di rischio</b>	<b>Note</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	I,B,P
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2	I,B
<i>Pseudomonas corrugata</i>	1	B
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	I,B,P
<i>Pseudomonas putida</i>	1	I,B
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	I,B
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	1	B
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	1	I,B
<i>Pseudomonas</i> spp.	1/2	B
<i>Rhodococcus globerulus</i>	1	B
<i>Rhodococcus rhodochrus</i>	1	B
<i>Rhodococcus</i> spp.	1/2	I,B
<i>Salmonella</i> spp.	2	P
<i>Serratia</i> spp.	1/2	PB
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	I,B
<i>Shigella</i> spp.	2/3	P
<i>Sphaerotilus</i> spp.	1	B
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	I,B
<i>Sphingonomas</i> spp.	1/2	I,B,P
<i>Spirillum</i> spp.	1	B,P
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	P
<i>Streptomyces</i> spp.	1/2	I,P
<i>Thermomicrobium</i> spp.	1	B
<i>Variovorax paradoxus</i>	1	I
<i>Vibrio furnissii</i>	2	B
<i>Vibrio metschnikovii</i>	2	I,P
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	2	I,B
<i>Xanthomonas</i> spp.	1	B
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	1	B
<b>Funghi</b>		
<i>Agaricus bisporus</i>	1	B
<i>Alternaria alternata</i>	1	A
<i>Aspergillus flavus</i>	2	A
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	A
<i>Aspergillus glaucus</i>		A
<i>Aspergillus nidulans</i>		A,B
<i>Aspergillus niger</i>	1	A,B
<i>Aspergillus oryzae</i>		A
<i>Aspergillus repens</i>		A
<i>Aspergillus restrictum</i>		A
<i>Aspergillus sydowi</i>		A

Continua

Segue: Tabella 3

<b>Microrganismi</b>	<b>Classe di rischio</b>	<b>Note</b>
<i>Aspergillus terreus</i>	1	A,B
<i>Aureobasidium pullulans</i>		A
<i>Bispora effuea</i>		A
<i>Blastomyces dermatidis</i>	3	P
<i>Botrytis effusa</i>		A
<i>Candida albicans</i>	2	A
<i>Candida tropicalis</i>	1	B
<i>Chaetomium globosum</i>	1	A
<i>Chaetomium indicum</i>		A
<i>Cladosporium herarum</i>		A
<i>Coccidioides immitis</i>	3	P
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	P
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	1	B
<i>Curvularia lunata</i>		A
<i>Curvularia spicifera</i>		A
<i>Epicoccum purpurascens</i>		A
<i>Fusarium culmorum</i>		A
<i>Fusarium solani</i>	2	A
<i>Fusarium oxysporum</i>		A
<i>Histoplasma capsulatum</i>	3	P
<i>Histoplasma duboisii</i>	3	P
<i>Hypholoma spp.</i>		B
<i>Khyneromyces spp.</i>		B
<i>Merulius lacrimans</i>		A
<i>Microsporum canis</i>	2	A
<i>Mucor spp.</i>	1	A
<i>Mycogone spp.</i>		A
<i>Neurospora sitophila</i>		A
<i>Neurospora crassa</i>		A
<i>Paecilomyces spp.</i>	1	A
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	A
<i>Penicillium atramentosum</i>		A
<i>Penicillium biforne</i>		A
<i>Penicillium brevicompactum</i>		A
<i>Penicillium roseopurpureum</i>		A
<i>Penicillium commune</i>		A
<i>Penicillium chrysogenum</i>		A
<i>Penicillium digitum</i>		A
<i>Penicillium expansum</i>		A
<i>Penicillium frequentans</i>		B
<i>Penicillium simplicissimum</i>	1	B
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	A

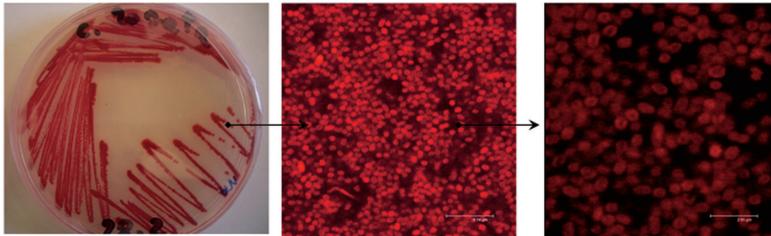
Continua

Segue: Tabella 3

Microrganismi	Classe di rischio	Note
<i>Phoma</i> spp.		A
<i>Phycomycetes</i> spp.		A
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	A,B
<i>Pullularia-Aureobasidium pullulans</i>		A
<i>Rhizomucor pusillus</i>		A
<i>Rhizopus (nigrificans) stolonifer</i>	1	A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	A
<i>Serpula lacrymans</i>		A
<i>Spondylocladum species</i>		A
<i>Sporobolomyces</i> spp.		A
<i>Stemphylium botryosum</i>		A
<i>Stropharia rugosa</i>		B
<i>Trametes versicolor</i>	1	B
<i>Trichoderma viride</i>	1	B
<i>Trichophyton species</i>	2	A
<i>Ustilago</i> spp.		A
<i>Wallemia</i>		A

**Note:**

- I = specie isolata da campioni di siti (suolo-acque) contaminati;
- B = di possibile impiego nelle bonifiche;
- P = patogeno per l'uomo;
- A = allergenico.

**Figura 8:** *Serratia* sp. idrocarburo-ossidante

## 5. L'impiego di MOGM nella *bioremediation*

Per rendere più efficaci le tecniche di biorisanamento è spesso previsto l'uso di surfattanti, che permettono di aumentare la solubilità degli idrocarburi, così come inoculi di microrganismi specializzati, anche se non sempre i risultati sono quelli attesi, considerata l'elevata competizione che si instaura tra le flore microbiche autoctone, acclimatate alle condizioni ambientali del sito ed i ceppi coltivati in laboratorio in condizioni controllate [81].

Di fronte a questo problema i microbiologi molecolari hanno spesso suggerito l'uso di microrganismi geneticamente modificati (MOGM) per la degradazione di xenobiotici recalcitranti come un potenziale strumento per migliorare e accelerare il risanamento di siti inquinati. I progressi nelle tecniche di ingegneria genetica e proteica hanno infatti aperto nuove vie verso la creazione di MOGM, in modo da combinare vie degradative, o enzimi di organismi diversi, in un unico ospite con lo scopo di migliorare specifiche reazioni [82]. Negli anni le tecniche del DNA ricombinante hanno permesso di ottenere ceppi microbici con aumentate capacità di biodegradazione, presenza di resistenze a solventi o capacità di accumulare e/o immobilizzare metalli pesanti [83-85].

Batteri resistenti alle radiazioni sono stati geneticamente modificati utilizzando specifici geni catabolici per renderli adatti al trattamento con misture di rifiuti organici, metalli pesanti e radionuclidi ad alta energia [86]. Anche l'ingegneria proteica può essere un utile mezzo per la creazione di enzimi più stabili o per modificare la specificità di substrato e le proprietà cinetiche dei complessi enzimatici. Tuttavia, la legislazione nazionale in materia (D.Lgs. 152/2006, Parte IV del Titolo V) [87] permette l'utilizzo di MOGM unicamente all'interno di bioreattori in modo da mantenere condizioni operative confinate come misura precauzionale al rilascio incontrollato nell'ambiente [88]. Una volta terminato il ciclo di trattamento nel bioreattore, le matrici, prima di una eventuale ricollocazione nella giacitura originaria, devono essere sottoposte a procedure atte a favorire una diffusa ricolonizzazione da parte di comunità microbiche naturali, in modo da ricondurre il numero dei MOGM inoculati a valori inferiori a 103 UFC (unità formanti colonie) per g di suolo o mL di acqua sottoposti a trattamento di bonifica [87].

## 6. Valutazione del rischio biologico connesso alle operazioni di bonifica

La valutazione del rischio biologico è una procedura complessa che deve prendere in considerazione i pericoli, ossia gli agenti biologici potenzialmente presenti nell'ambiente lavorativo ed il rischio, ossia la probabilità statistica che l'evento dannoso si realizzi in quelle specifiche condizioni di esposizione.

Ai fini della valutazione del rischio il Titolo X del D.Lgs. 81/2008 dispone che il datore di lavoro consideri tutte le informazioni disponibili relative alle caratteristiche degli agenti biologici utilizzati o potenzialmente presenti nel materiale trattato e delle

modalità operative in cui essi vengono coinvolti ed in particolare:

- a) della classificazione in termini di pericolosità degli agenti biologici che presentano o possono presentare un pericolo per la salute umana (come dall'Allegato XLVI del D.Lgs. 81/2008);
- b) dell'informazione sulle malattie che possono essere contratte a seguito dell'esposizione lavorativa;
- c) dei potenziali effetti allergici e tossici dei microorganismi e/o loro parti;
- d) della conoscenza di una patologia della quale sia affetto un lavoratore, correlabile all'attività lavorativa svolta.

## 7. Le relazioni dose-effetto degli agenti biologici

La disponibilità di dati sulle relazioni dose-effetto degli agenti biologici permetterebbe la definizione dei valori limite dell'esposizione al fine di garantire una corretta interpretazione dei risultati ottenuti attraverso le misurazioni effettuate nel corso del procedimento di valutazione del rischio. A tutt'oggi, come detto, non esistono relazioni dose-effetto e valori limite dell'esposizione professionale (OEL) agli agenti biologici e la normativa vigente definisce i valori limite dell'esposizione agli agenti biologici solo con riferimento ad alcuni tipi di tossine, o per agenti quali la polvere di legno, la subtilisina e la polvere di farina [89]. Anche i valori limite dell'esposizione alle endotossine batteriche sono stati per il momento proposti ma non ancora definiti con certezza [90], anche a causa della mancanza di univoche metodologie di valutazione quantitativa dell'esposizione [91]. Un'altra importante limitazione alla definizione di relazioni dose-effetto è riconducibile al fatto che il ruolo ricoperto dagli agenti biologici nell'evolversi o nell'aggravarsi dei sintomi e delle malattie è stato per ora compreso solo in minima parte [92].

I microrganismi sono inoltre caratterizzati dalla costante capacità di reagire e interagire con l'ambiente circostante e risultano in grado di modificare velocemente la loro espressione genica in risposta ai diversi segnali ambientali. Tale costante capacità di adattamento determina notevoli differenze nella interazione microrganismo-ospite, come dimostrano i dati scientifici in materia [93, 94].

Molto scarse sono inoltre le informazioni relative alle dosi infettanti dei microrganismi: alcuni possono risultare patogeni in quantità estremamente ridotte, mentre altri organismi possono costituire un importante rischio per la salute solamente quando raggiungono concentrazioni più elevate. È possibile inoltre osservare notevoli differenze nel grado di infettività fra i diversi isolati della stessa specie, lasciando quindi intuire che alcuni risultano più virulenti di altri [95, 96].

Anche il processo di formazione dei biofilm da parte dei microrganismi, ad esempio, contribuisce ad accrescere la capacità di sopravvivenza degli organismi patogeni e questo complica la definizione della relativa dose infettiva [97-99].

Per l'esposizione alle endotossine batteriche ed alle spore fungine, numerosi studi hanno evidenziato l'esistenza di una complessa relazione non lineare e dose-dipen-

dente tra l'esposizione ambientale e l'esito delle risposte immunitarie. L'esposizione a tali agenti sembra avere un ruolo critico nella patogenesi di malattie complesse quali l'asma, l'atopia, le allergie respiratorie e la sensibilizzazione agli allergeni. È dimostrato come tali agenti possano indurre malattia oppure al contrario creare perfino dei meccanismi di difesa contro di esse [100-107].

La valutazione delle relazioni dose-risposta è inficiata ulteriormente dall'estrema variabilità della risposta umana all'esposizione agli agenti biologici. Esiste infatti una notevole diversità fra le varie forme di predisposizione individuale a infezioni e allergie. La resistenza all'infezione batterica si presenta come un carattere ereditario controllato da diversi geni e, poichè il sistema immunitario congenito ricopre un ruolo di fondamentale importanza nel precoce contenimento dell'infezione, le eventuali variazioni o mutazioni genetiche che alterano la funzione immunitaria risultano determinanti nello sviluppo della malattia [108, 109].

## **8. La casistica epidemiologica a supporto della valutazione del rischio**

Dalla rassegna riportata dei pericoli di natura biologica ai quali possono essere esposti i lavoratori del settore bonifiche emerge chiaramente quanto siano numerosi gli agenti biologici (microrganismi e/o loro parti o prodotti) potenzialmente presenti nelle matrici contaminate (acque, suoli, aerosol).

Emerge con altrettanta chiarezza che, ai fini di valutare il rischio, la rilevanza della stima dell'entità dell'esposizione, attraverso ad esempio il monitoraggio microbiologico ambientale, è limitata per le difficoltà connesse alla interpretazione delle dosi espositive.

Quindi se l'identificazione dei pericoli può essere effettuata valutando la presenza anche solo presunta di agenti biologici durante le attività lavorative, la valutazione del rischio biologico si basa sulla casistica epidemiologica, cioè verificando in letteratura quali patologie sono state messe in correlazione con determinate tipologie espositive e sull'osservazione dello stato di salute del lavoratore [4].

È responsabilità dell'azienda utilizzare tutte le fonti scientifiche informative con particolare riguardo a quelle che si riferiscono al comparto di specifico interesse. Nel settore delle bonifiche non sono disponibili in letteratura dati epidemiologici sulle infezioni/sintomatologie/malattie più frequentemente osservate nei lavoratori e certamente il rischio prevalente è quello di natura chimica.

Dal momento che i rischi biologici connessi alle attività di bonifica possono essere equiparati a quelli del settore dell'edilizia, dell'agricoltura e dello smaltimento acque reflue, è possibile fare riferimento alla casistica epidemiologica esistente per questi settori occupazionali.

Nel settore agricolo le patologie a carico dei lavoratori vanno ascritte alla esposizione ad alcuni agenti infettivi e parassitari, ma anche a più generiche forme anafilattiche riconducibili alla presenza di sostanze ad attività antigenica di origine animale, vegetale e/o microbica [110].

Alcuni degli agenti eziologici contenuti nelle polveri organiche sono riconosciuti dall'Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL) quali causa di malattie professionali. Il D.M. 9 aprile 2008 [111] pubblica le nuove Tabelle delle malattie professionali che consentono il riconoscimento automatico dell'origine professionale di specifiche patologie professionali. Per le malattie dell'apparato respiratorio sono compresi gli agenti causa di asma bronchiale allergico di origine vegetale (polvere e farina di cereali, di legno, gli enzimi), di origine animale e le spore fungine di *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Quali agenti causali delle alveoliti allergiche estrinseche sono riconosciuti le spore degli attinomiceti termofili ed i miceti (*Aspergillus*, *Penicillium*, etc.).

L'inalazione a lungo termine di polveri organiche può causare infatti nei lavoratori esposti l'infiammazione del tratto respiratorio come risultato di reazioni allergiche specifiche [112-115] o di reazioni immunotossiche non specifiche, che comportano l'attivazione di macrofagi alveolari e citochine [116-119].

Queste reazioni sono indotte principalmente dai microrganismi associati alle polveri organiche e più in particolare dai batteri gram-negativi che producono allergeni ed endotossine, da attinomiceti e funghi filamentosi che producono allergeni, (1→3)-β-D-glucani e micotossine [120-128].

Nel settore agricolo l'asma bronchiale e le alveoliti allergiche, tra le malattie tabellate, e le malattie dell'apparato respiratorio, tra quelle non tabellate, mostrano continui trend di crescita [133]. In generale tutte le allergopatie professionali mostrano un costante aumento di frequenza e studi epidemiologici evidenziano che l'asma attribuita a cause professionali risulta compresa tra il 2 ed il 15% [134-137].

Nel settore della depurazione delle acque reflue le patologie descritte sono per lo più aspecifiche e passano spesso inosservate. La letteratura indica casi di infezioni, a carattere occasionale, in organismi immunodepressi o debilitati [138].

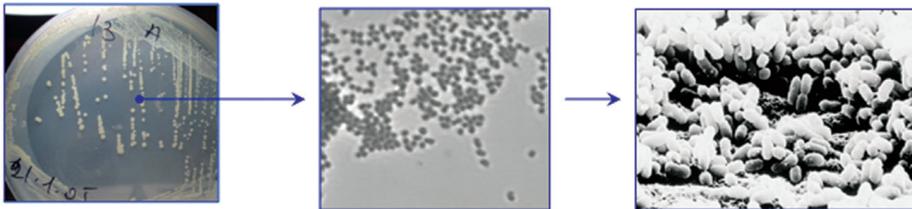
Diversi lavori scientifici riportano specifiche sintomatologie a carico dei lavoratori del settore con una maggiore frequenza di disturbi simil-influenzali tra i lavoratori degli impianti di depurazione [139-142]. Risultano più ricorrenti febbri che compaiono dopo poche ore di lavoro, mialgie, bruciori agli occhi (sintomo più frequente che si verifica nel 50% dei casi di malessere), eritemi cutanei, mal di testa, astenia, rinite acuta, disturbi diarroici improvvisi [143-150]. Questa sintomatologia, descritta fin dal 1976 e definita *sewage workers' syndrome* è appunto riconducibile all'esposizione ad endotossine batteriche [151-152].

Alcuni studi riportano inoltre un maggior rischio/prevalenza per asma e bronchiti croniche a carico dei lavoratori del settore acque reflue [146, 147], così come si osserva un decremento dei valori di funzionalità polmonare [145, 146]. Anche in assenza di quadri clinici conclamati, nei lavoratori del settore dello smaltimento acque reflue si segnala la presenza di aumentati livelli di immunoglobuline circolanti e positività sierologica nella ricerca di anticorpi specifici nei confronti di vari microrganismi [153] a testimonianza di una avvenuta colonizzazione e di una risposta da parte del sistema immunitario dei soggetti esposti. Tali osservazioni indicano l'importanza di una copertura immunitaria che si crea con la esposizione progressiva e che riduce il

rischio di malattie acute conclamate, come viene evidenziato dai frequenti disturbi gastrointestinali osservati spesso tra i nuovi assunti [154, 155], ma che non compaiono più nei lavoratori più anziani.

Altri studi riportano una maggiore prevalenza di anticorpi contro il virus dell'epatite A [156-160] e per la leptospirosi [161]. L'incidenza delle parassitosi intestinali da *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* risulta essere più elevata nei lavoratori degli impianti di trattamento acque reflue e questo costituisce sicuramente uno dei principali rischi da prevenire, anche perché contro gli agenti che le determinano non si forma copertura immunitaria [162-163].

**Figura 9:** *Neisseria* sp. idrocarburo-ossidante



## 9. Il monitoraggio microbiologico ambientale

Il monitoraggio microbiologico ambientale negli ambienti di lavoro non è obbligatorio ai sensi del D.Lgs. 81/2008 [2] al fine della valutazione del rischio biologico.

Tali monitoraggi risultano complessi e spesso non esaustivi, considerata l'impossibilità di rilevare tutti gli agenti biologici che possono essere presenti nelle diverse matrici dalle quali dipende l'esposizione.

È fondamentale sottolineare che il non rilevamento di uno specifico agente biologico nella matrice monitorata, non permette di escluderne la presenza, sia perché i metodi colturali routinariamente adottati non sono in grado di mettere in evidenza tutti i microrganismi potenzialmente presenti, sia perché non si può escludere che un determinato patogeno possa essere presente in quella stessa matrice anche solo poco tempo dopo aver effettuato il campionamento, in seguito all'instaurarsi delle condizioni ambientali più favorevoli ad una sua sopravvivenza e successiva moltiplicazione. I microrganismi ambientali sono spesso di difficile coltivazione perché si trovano nello stato definito come VBNC (*viable but not culturable*), ossia vitali ma non coltivabili, che è uno stato che possono assumere molte specie microbiche quando sono sottoposti a cambiamenti delle condizioni in cui vivono, che possono riguardare ad esempio la quantità di nutrienti [164-166].

Specie il monitoraggio dei bioaerosol risulta particolarmente complesso per la molteplicità di agenti biologici che esso può contenere: batteri, funghi, virus, allergeni, endotossine batteriche, micotossine, peptidoglicani, pollini, fibre vegetali, etc. Non

esistono metodi di campionamento ed analisi dell'aria per la quantificazione dell'esposizione a bioaerosol che siano universalmente riconosciuti e questo rende complicato stabilire le relazioni causa effetto tra gli specifici parametri microbiologici e problemi di salute e, quindi, la definizione di limiti di accettabilità dell'esposizione professionale [91, 167-169].

Nei casi in cui si proceda al monitoraggio microbiologico ambientale è quindi opportuno definire a priori la gestione dei risultati del monitoraggio.

Per la sorveglianza routinaria dell'aria dell'ambiente lavorativo può essere utile procedere a monitoraggi per valutare se le concentrazioni microbiche rilevate nelle aree di lavoro durante le diverse attività (scavi, carico/scarico di terreno, rivoltamento dei cumuli, etc.) risultino superiori a quelle di aree esterne all'impianto, utilizzando come indicatori le conte batteriche totali, ossia quelle dei microrganismi vitali e non vitali, dal momento che anche questi ultimi sono da considerarsi un pericolo espositivo per il lavoratore [170].

Anche la tipizzazione delle specie batteriche può risultare non esaustiva dal momento che i routinari test biochimici spesso non sono in grado di discriminare i ceppi microbici di derivazione ambientale, perché calibrati e validati per le specie microbiche di maggior diffusione e frequenza negli ambienti sanitari.

La tipizzazione delle specie microbiche risulta invece fondamentale quando è necessario procedere al rilevamento di ceppi specifici ad elevata pericolosità di cui si sospetta la presenza nella matrice ambientale contaminata, come ad esempio *Bacillus anthracis* (classe 3) e per dimostrare la presenza di specie patogene specifiche, ad esempio di origine fecale, quali *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* [79] o quando è necessario determinare la correlazione clonale tra isolati clinici e isolati ambientali al fine di individuare l'origine di eventuali malattie infettive a seguito dell'esposizione occupazionale.

L'utilizzo dei metodi molecolari agevola anche la caratterizzazione dei numerosi taxa fungini con potenzialità allergeniche [171-175].

**Figura 10:** *Doratomyces* sp. idrocarburo-ossidante



## 10. La gestione del rischio biologico durante le attività di bonifica

Dalle considerazioni sopra esposte risulta chiaro che l'approccio più corretto per il controllo del rischio biologico connesso alle operazioni di bonifica è quello preventivo attraverso la riduzione al più basso livello possibile dell'entità dell'esposizione individuale.

Dopo l'individuazione delle lavorazioni/operazioni/fasi in cui può determinarsi l'esposizione, anche solo presunta, ad un possibile pericolo biologico, si procede alla definizione delle misure di contenimento e/o delle modalità operative, tanto più restrittive quanto maggiore è il rischio di contaminazione presente.

Nello specifico le misure tecniche, organizzative e procedurali al fine del contenimento del rischio biologico nelle operazioni di bonifica dei siti contaminati sono:

- mantenere al livello più basso praticabile il numero dei lavoratori esposti agli agenti biologici potenzialmente presenti nel luogo di lavoro;
- adottare procedure di lavoro e controlli di ingegneria tali da prevenire o minimizzare l'esposizione agli agenti biologici durante le diverse attività evitando il contatto con la pelle, con gli occhi e attraverso le vie aeree;
- apporre il segnale di rischio biologico nelle aree di lavorazione;
- minimizzare la formazione di polveri, causate dal risollevarsi delle stesse dalle pavimentazioni stradali dovute al transito dei mezzi pesanti, dalle superfici sterrate dei piazzali ad opera del vento, da emissioni localizzate nelle aree di deposito degli inerti, dagli eventuali impianti di betonaggio e di frantumazione. È raccomandabile minimizzare il traffico dei veicoli sui terreni contaminati e la loro velocità;
- prevedere misure di mitigazione, interventi operativi e attenzioni che possono essere efficacemente controllati in fase di costruzione e di programmazione delle attività di cantiere: copertura dei carichi che possono essere dispersi in fase di trasporto; pulizia ad umido dei pneumatici degli autoveicoli in uscita dal cantiere tramite apposite vasche d'acqua e spruzzatori; asfaltatura delle piste interne all'area di cantiere interessate dalla movimentazione degli automezzi; predisposizione di impianti a pioggia per le aree del deposito inerti; apporre teloni di copertura ove necessario, installazione di schermi per fungere da frangivento, programmare operazioni di innaffiamento con autobotti delle piste di cantiere e pulizia delle stesse;
- prevedere una ventilazione forzata quando si opera in luoghi confinati (tunnel, garage, etc.);
- equipaggiare i macchinari per la lavorazione del terreno con sistemi di ventilazione dedicati, preferibilmente mediante l'utilizzo di filtri HEPA, monitorando periodicamente lo stato delle guarnizioni delle porte, provvedendo alla manutenzione dei filtri ed annotando la manutenzione su apposito registro;
- fornire ai lavoratori gli appositi dispositivi di protezione individuale quali: indumenti protettivi (tuta in tyvek, stivali, guanti), maschere per la protezione delle vie respiratorie per evitare la contaminazione con polveri/spore o bioaerosol;

- mantenere l'obbligo dell'utilizzo delle maschere per la protezione delle vie respiratorie anche al termine della bonifica, quando ad esempio viene ripristinato lo strato di terreno originale dopo bonifica o altro terreno; nel suolo, infatti, anche se non più contaminato da sostanze tossiche, sono comunque presenti agenti biologici fonte di rischio quali batteri, attinomiceti, muffe, spore fungine, endotossine batteriche;
- obbligo per il lavoratore di mantenere separati gli abiti di lavoro da quelli civili, anche al fine di prevenire e ridurre al minimo la propagazione microbica fuori dal luogo di lavoro;
- obbligo di rispetto delle misure igieniche più elementari con apposita cartellonistica (non mangiare, non bere e non fumare sul sito; lavaggio frequente delle mani, almeno prima dei pasti e dei break, fare una doccia al termine del proprio turno lavorativo);
- mettere a disposizione del lavoratore strutture igieniche dedicate (spogliatoi, docce, lavabi, detersivi, disinfettanti, etc.);
- informare i lavoratori sui pericoli e rischi biologici specifici in funzione dei compiti delle mansioni e delle responsabilità;
- addestrare e formare il lavoratore a svolgere le proprie mansioni in sicurezza e per affrontare le emergenze;
- definire procedure per la gestione delle emergenze e per il primo soccorso;
- nel caso si faccia ricorso a inoculi microbici specifici, che prevedano arricchimenti colturali (sospensioni microbiche, inoculi liofilizzati commerciali, etc.), le varie operazioni previste devono essere eseguite sotto la guida di specialisti di microbiologia;
- nelle pratiche di *bioaugmentation* delle matrici contaminate, per i microrganismi, precoltivati in laboratorio o disponibili in commercio, deve essere richiesta la caratterizzazione microbiologica prima del loro utilizzo. Alcuni preparati commerciali (starters microbici) possono infatti contenere microrganismi patogeni o patogeni opportunisti in elevate concentrazioni (oltre  $10^9$  ufc/ml);
- devono essere valutate le caratteristiche igienico-sanitarie, attraverso la ricerca di indicatori di contaminazione fecale (ad es. enterococchi fecali), delle matrici organiche addizionate per stimolare i processi biodegradativi (compost, liquami, fanghi di depurazione, etc.);
- é necessario porre particolare attenzione alle condizioni di stoccaggio del materiale organico da utilizzare come ammendante (fieno, stallatico, compost) evitando che si instaurino condizioni di elevata umidità che favoriscono la formazione di specie fungine e condizioni di microaerofilia o anaerobiosi che permettono la proliferazione di generi microbici anaerobi obbligati o facoltativi (*Clostridium*, *Bacillus*), da considerare patogeni opportunisti.

## 11. La sorveglianza sanitaria dei lavoratori del settore bonifiche

La sorveglianza sanitaria è uno degli elementi che, unitamente alla valutazione dei rischi condotta nei termini sopraccitati, concorre al controllo del rischio negli ambienti di lavoro.

I piani di sorveglianza sanitaria dei lavoratori addetti alle attività di indagini e bonifiche ambientali sono in genere indirizzati alla rilevazione di alterazioni generiche dello stato di salute. La principale difficoltà risulta proprio l'identificazione delle esposizioni prevalenti, trattandosi di lavoratori che sono esposti a miscele di inquinanti, variabili nel tempo in quanto si succedono interventi in aree sempre diverse [6].

L'utilizzo di indicatori biologici di esposizione rappresentativi non è agevole da applicare, come pure l'identificazione di indicatori di funzionalità di organi od apparati bersaglio. In molti casi tuttavia, pur essendo chiaramente riconoscibile una esposizione prevalente, non vengono sufficientemente utilizzati indicatori specifici [6].

È fondamentale invece l'adozione di una forma di registrazione individuale delle diverse esposizioni del lavoratore che permetta una stima di esposizione cumulativa annuale sulla quale impostare piani di sorveglianza sanitaria più mirata.

Si ribadisce che nella sorveglianza sanitaria assume rilievo fondamentale il sistema di sorveglianza epidemiologica, inteso come osservatorio che deve essere istituito in ciascun ambiente di lavoro in modo da consentire di utilizzare al meglio i dati sia della valutazione dei rischi che della gestione degli stessi, al fine di raggiungere una migliore qualità delle verifiche di efficacia delle misure di controllo del rischio [4].

Il sistema di sorveglianza epidemiologica dei lavoratori deve necessariamente contemplare il rischio biologico, specie quello allergico, come dimostrato dalla casistica epidemiologica di settori affini (agricolo, trattamento delle acque reflue). È infatti verosimile che tra i lavoratori del settore siano prevalenti manifestazioni patologiche quali le sindromi da polveri organiche, irritazione della pelle, degli occhi, delle mucose del naso e delle prime vie aeree, connesse all'esposizione aerea a polveri e aerosol contenenti spore fungine, microfunghi, attinomiceti, endotossine batteriche, etc. La ricerca delle condizioni di ipersuscettibilità è un elemento fondamentale delle visite preventive. Possono costituire condizioni di ipersuscettibilità individuale nei confronti delle malattie infettive, eventuali fattori personali di predisposizione a contrarre affezioni da allergeni, le patologie della cute e delle mucose che ne riducono le proprietà di barriera, le flogosi in atto, i deficit immunologici congeniti ed acquisiti.

Per la prevenzione delle allergopatie professionali risulta utile l'adozione di protocolli sanitari specifici che prevedano la collaborazione di specialisti del settore, in modo da far venire alla luce il ruolo, almeno concausale, degli inquinanti professionali aerodispersi e non unicamente di quelli extra-occupazionali, nella genesi di tali patologie. Il medico competente che diagnostichi nel corso degli accertamenti sanitari preventivi e/o periodici una malattia di presunta origine professionale dovrà darne comunicazione agli Enti competenti.

Considerata la scarsa specificità di certe patologie e quindi la non facile diagnosi di una malattia da agenti biologici di origine occupazionale, si sottolinea l'importanza

della istituzione del registro dei casi di malattia e decesso (art. 281 del D.Lgs. 81/2008) che prevede la registrazione di tutte le malattie riconducibili ad esposizione professionale ad agenti biologici, quindi oltre alle infezioni, le allergie e gli effetti tossici ed è opportuno stimolare la trasmissione di queste informazioni. Tale obbligo da parte del medico di comunicare all'INAIL tali informazioni, non lo esonera comunque dagli obblighi di denuncia secondo l'attuale sistema di certificazione delle patologie soggette a provvedimenti di comunicazione alle Autorità sanitarie, attraverso il quale si assicura un flusso informativo integrato tra i vari servizi interessati: medico, ASL, Regione, ISS, Ministero della salute.

Anche se previsto come obbligo solo per le attività comportanti uso di agenti biologici di gruppo 3 e 4 (art. 280 del D.Lgs. 81/2008) è opportuno stimolare un sistema di registrazione di tutti gli episodi di contaminazione con materiale biologico. Tale registrazione permette un più facile riconoscimento del nesso di causalità della malattia professionale (se del caso), così come una migliore programmazione degli interventi di prevenzione, ossia tutte quelle misure atte ad evitare o quantomeno a contenere le possibili conseguenze di un incidente con contaminazione biologica.

Considerando che nel futuro le attività di bonifica dei siti contaminati saranno intensificate è opportuno stimolare la sorveglianza epidemiologica dei lavoratori del settore al fine di disporre di maggiori informazioni sulle problematiche di salute manifestate, anche tenuto conto che le conoscenze riguardanti i rischi biologici sono ancora relativamente scarse e che la gestione del rischio risulta ancora inadeguata, soprattutto nei luoghi di lavoro ad esposizione potenziale ad agenti biologici.

## Riferimenti bibliografici

1. Ledda A, Bemporad E, Berardi S (2012). Review of the Main Guidance Documents on Occupational Safety and Health in the Remediation of Contaminated Sites. *Chemical Engineering Transactions* 28:1-6.
2. Decreto legislativo 9 aprile 2008, n 81. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. *Gazzetta Ufficiale* n. 101 del 30 aprile 2008.
3. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of the 18th September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. *Official Journal* L 262/21 of 17/10/2000.
4. Coordinamento Tecnico per la prevenzione degli assessorati alla Sanità delle Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano (1998). Decreto Legislativo n. 626/1994. Documento n. 16. Linee guida su Titolo VIII. Protezione da agenti biologici. Versione definitiva approvata il 16 luglio 1996 dalle Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano e dagli Istituti centrali.
5. Hirschmann JV, Sudhakar MD, Pipavath NJ, David J, Godwin MD (2009). Hypersensitivity Pneumonitis: a historical, clinical, and radiologic Review. *RadioGraphics*, 29:1921-1938.
6. ISPESL (2000). Progetto SIPRE. Profili di rischio nelle attività di indagine, bonifica, messa in sicurezza delle aree industriali dismesse. URL: [www.ispesl.it/profili\\_di\\_rischio/\\_aree/index.asp](http://www.ispesl.it/profili_di_rischio/_aree/index.asp).
7. Levy BS, Wegman DH (2000). *Occupational health: recognizing and preventing work-related disease and injury*. 4th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
8. Valentino M, Rapisarda V (2001). Tetanus in a central Italian region: scope for more effective prevention among unvaccinated agricultural workers. *Occup Med*, 51 (2):114-117.
9. Saile E, Koehler TM (2006). *Bacillus anthracis* Multiplication, Persistence, and Genetic Exchange in the Rhizosphere of Grass Plants *Applied Environmental Microbiology* 72(5):3168-3174.
10. Daniel TM, Bain GL (2002). Epidemics are for the Birds-and Bats. In *Drama and Discovery: the Story of Histoplasmosis*. Westport, CT: Greenwood Press pp. 77-83.
11. Dutkiewicz J, Jablonski L, Olenchock SH (1988). Occupational biohazards: A review. *Am J Ind Med*, 14(5):605-623.
12. Hagen F, Colom MF, Swinne D, Tintelnot K, Iatta R, Montagna MT, Torres-Rodriguez JM, Cogliati M, Velegriaki A, Burggraaf A, Kamermans A, Sweere JM, Meis JF, Klaassen C, Boekhout T (2012). Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg Infect Dis*, 18 (10):1618-1624.

13. Bartlett K (2006). Investigation of Occupational Exposures to Forestry Workers from Environmental *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* . Work Safe British Columbia. RS2002-03-DG12.
14. Grazioli D (2008). Epidemiologia e prevenzione delle malattie da zecche nell'ULSS 2 del Veneto. Santuario S.S. Vittore e Corona, 21 maggio 2008.
15. Calza L, Manfredi R, Chiodo F (2004). Le infezioni trasmesse dal morso di zecca. *Recenti progressi in medicina*, 94( 9): 403-413.
16. Lehtola MJ, Torvinen E, Kusnetsov J, Pitkanen T, Maunula L, von Bonsdorff CH, Martikainen PJ, Wilks SA, Keevil CW, Miettinen IT (2007). Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Caliciviruses* in Drinking Water-Associated Biofilms Grown under High-Shear Turbulent Flow. *Appl Environ Microbiol*, 73(9): 2854-2859.
17. Gregersen P, Grunnet K, Uldum SA (1999). Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry. *Scand J Work Environ Health*, 25:291-295.
18. Kusnetsov J, Neuvonen LK, Korpio T, Uldum SA, Mentula S, Putus T, Tran Minh NN, Martimo KP (2010). Two Legionnaires' disease cases associated with industrial waste water treatment plants: a case report. *BMC Infect Dis*, 2 (10):343.
19. Thorn J, Kerekes E (2001). Health effects among employees in sewage treatment plants: A literature survey. *Am J Ind Med*, 40(2):170-179.
20. Falkinham JO III (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol*, 107:356-367.
21. Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, Tamaru A, Taguri T, Kira Y (2007). The recovery of *Mycobacterium avium intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clin Infect Dis*, 45:347-351.
22. Falkinham JO III, Iseman MD, De Haas P, Van Soolingen D (2008). *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J Water Health*, 6:209-213.
23. Falkinham JO III (2011). Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacterial disease. *Emerg Infect Dis*, 17:419-424.
24. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F (2007). An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 175:367-416.
25. Woods GL, Washington JA (1987). Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiological and clinical aspects. *Rev Infect Dis*, 9:275-294.
26. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, Gottlieb JE, Scott R, Israel HL, Figueroa WG, Fish JE (1989). Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *New Engl J Med*, 321(13):863-868.

27. Division of Occupational Safety and Health, DOSH (2011). Health Hazards in Construction. Washington State Department of Labor & Industries.
28. UNIONS SAFE. Health Hazards in Construction Sites. 2005 [consultato gennaio 2013]. URL: <http://unionsafe.net.au/hazards/104734609525712.html>.
29. Eduard W, Heederik D, Duchaine C, Green BJ (2012). Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J Environ Monit*, 14(2):334-339.
30. Nieminen SM, Karki R, Auriola S, Toivola M, Laatsch H, Laatikainen R, Hyvarinen A, von Wright A (2002). Isolation and Identification of *Aspergillus fumigatus* Mycotoxins on Growth Medium and Some Building Materials. *Appl Environ Microbiol*, 68(10):4871-4875.
31. Dillon HK, Heinshon PA, Miller JD (2005). Field Guide for the Determination of Biological Contaminant in Environmental Samples. II Edition, p. 284.
32. Bouza E, Peláez T, Pérez-Molina J, Marín M, Alcalá L, Padilla B, Muñoz P, Adán P, Bové B, Bueno MJ, Grande F, Puente D, Rodríguez MP, Rodríguez- Créixems M, Vigil D, Cuevas O (2002). *Aspergillus* Study Team. Demolition of a hospital building by controlled explosion: the impact on filamentous fungal load in internal and external air. *J Hosp Inf*, 52 (4): 234-242.
33. Streifel J, Lauer JL, Vesley D, Juni B, Rhame FS (1983). *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi generated by hospital building demolition. *Appl Environ Microbiol*, 46(2):375-378.
34. Malani AN, Kauffman CA.(2007). Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* 67:1803-1812.
35. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL (2005). Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*, 2005;41:634-653.
36. Robert VA, Casadevall A (2009). Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *J Infect Dis*, 200:1623-1626.
37. Bouza E, Munoz P (2004). Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium spp*. *Clin. Microbiol Infect*, 10 (Suppl 1):76-85.
38. Davolos D, Pietrangeli B (2011). Investigating cultivable and uncultivable airborne micro fungi from waste treatment plants and other workplaces. Proc. 13th Int. Waste Management and Landfill Symposium. S. Margherita di Pula (Cagliari), 3-7 ottobre 2011. pp. 1059-1060.
39. Hardin BD, Kelman BJ, Saxon A (2003). Adverse human health effects associated with molds in the indoor. *J Occup Environ Med*, 45(5):470-478.
40. Hodgson MJ, Philip M, Wing-Yan BS; Morrow L, Miller D, Jarvis BB, Robbins H, Halsey JF, Storey E (1998). Building-Associated Pulmonary Disease From

- Exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *J Occup Environ Med*, 40 (3):241-249.
41. Fischer G, Dott W (2003). Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Arch. Microbiol*, 179 (2):75-82.
  42. Davolos D, Pietrangeli B (2007). Genetic analysis on amino-acid sequence data of allergen encoding genes from airborne moulds and yeasts. *Prevenzione Oggi, ISPEL*, 3(2):49-64.
  43. Davolos D, Fanizza C, Pietrangeli B (2012). Molecular diversity of potentially allergenic airborne *Penicillium spp.* assessed by DNA sequence and bioinformatic analysis. *Air Quality Management at Urban, Regional and Global Scales. Proc. 4th Int. Symposium, Istanbul, 10-13 September 2012.*
  44. Nierman WC (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438: 22-29.
  45. Bowyer P, Fraczek M, Denning DW (2006). Comparative genomics of fungal allergens and epitopes shows widespread distribution of closely related allergen and epitope orthologues. *BMC Genomics*, 7: 251-265.
  46. Davolos D, Pietrangeli B, Persiani AM, Maggi O (2012). *Penicillium simile* sp. nov. revealed by morphological and phylogenetic analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62:451-458.
  47. Davolos D, Persiani AM, Pietrangeli B, Ricelli A, Maggi O (2012). *Aspergillus affinis* sp. nov., a novel ochratoxin A-producing *Aspergillus* species (section *Circumdati*) isolated from decomposing leaves. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62: 1007-1015.
  48. Davolos D, Pietrangeli B (2007). DNA sequencing and phylogenetic analysis of allergen encoding genes from airborne moulds and yeasts. *Prevenzione Oggi, ISPEL*, 3(3): 23-35.
  49. Enitecnologie, Eni Corporate University (2007). *La bonifica biologica dei siti inquinati da idrocarburi. II Edizione.* Milano: Hoepli. pp. 1-169.
  50. Dechema (1992). *Laboratory methods for the evaluation of biological soil cleanup processes. 2nd Report of the Interdisciplinary Working Group "Environmental Biotechnology - Soil".* Frankfurt am Main.
  51. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Molecular Biology Review*, 67(4):503-549.
  52. Atlas RM (1984). *Pathways of hydrocarbon degradation.* In: *Petroleum Microbiology.* Macmillan Publishing Company, New York, USA, pp. 1-15.
  53. Okoh AL (2006). Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnol Molecular Biology Review*, 1(2):38-50.
  54. Kyung-Hwa B, Lee Y, Lee I, Oh H, Yoon B, Kim H (2004). Detection of *Nocardia*

- sp. H17-1 by PCR during bioremediation of crude oil-contaminated soil. *Kor J Microbiol Biotechnol*, 32 (1):91-95.
55. Beaman BL, Maslan S (1978). Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infection & Immunity*, 20(1):290-295.
  56. Desmond E, Flores M (1993). Mouse pathogenicity studies of *Nocardia asteroides* complex species and clinical correlation with human isolates. *FEMS Microbiol. Letters*, 110 (3): 281-284.
  57. Beaman BL, Saubolle MA, Wallace RJ (1995). *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia*, and other aerobic actinomycetes of medical importance, p. 379-399. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
  58. McNeil MM, Brown JM (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 7: 357-417.
  59. Sundermann A, Dieter M, Eckrich C, Janowitz A, Pipke R, Rumler A, Schappler-Scheele B, Schies U, Tommerdich D, Zeschmar-Lahl B, Zimmermann B (1996). Commission for Occupational Health, Safety and Standardization (KAN) KAN Study "Microorganisms in the workplace atmosphere - Actinomycetes".
  60. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS (2001). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Environ Res*, 86: 122-127.
  61. Tanner CM (1992). Occupational and environmental causes of parkinsonism. *Occup Med*, 7: 503-513.
  62. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurol* 50: 1346-1350.
  63. Janssen PH (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 72: 1719-1728.
  64. Cook C, Petrucelli L (2009). A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792: 664-675.
  65. McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 56: 149-162.
  66. Sun F, Anantharam V, Zhang D, Latchoumycandane C, Kanthasamy A, et al.(2006). Proteasome inhibitor MG-132 induces dopaminergic degeneration in cell culture and animal models. *NeuroTox*, 27: 807-815.
  67. Chakrabarty AM (1976). Plasmids in *Pseudomonas*. *Ann Rev Genet*, 10:7-30.
  68. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microb Infect*, 2:1051-1060.

69. Ramos JL, Dugue E, Gallegos MT (2002). Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 56(1):743-768.
70. Zakaria ZA, Zakaria Z, Surif S, Ahmad A (2006). Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy metal contaminated wastewater. *J Hazard Mat*, 146(1-2):30-38.
71. Jain R, Danziger LH (2004). Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Infections: An Emerging Challenge to Clinicians. *Ann Pharmacother*, 38:1449-1459.
72. Ryan MP, Adley CC (2010). *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *J Hosp Infect* 75(3):153-157.
73. Lin JN, Lai CH, Chen YH, Lin HL, Huang CK, Chen WF, Wang JL, Chung WF, Liang SH, Lin HH (2010). *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in humans: 16 case reports and a literature review. *Microbiol Immunol Infect*, 2010 Feb;43(1):35-42.
74. O'Sullivan LA, Mahenthiralingam E (2005). Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Lett Appl Microbiol*, 41:8-11.
75. Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Martinez-Aguilar L (2007). The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. *Appl Environ Microbiol*, 73(16): 5308-5319.
76. Davolos D, Pietrangeli B (2009). Molecular analysis on the lipid A biosynthesis of aerosolized *Pseudomonas spp.* ( -Proteobacteria) isolated from different workplaces. 2nd Int. Conf. Environ. Management, Engineering, Planning & Economics. Mykonos (Greece), 22-24 June 2009.
77. Madsen AM (2006). Airborne endotoxin in different background environments and seasons. *Ann Agric Environ Med*, 13:81-86.
78. Zhu X, Venosa AD, Suidan MT, Lee K (2001). Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. U.S. EPA, Cincinnati.
79. Luna GM, Dell'Anno A, Pietrangeli B, Danovaro R (2012). A new molecular approach based on qPCR for the quantification of fecal bacteria in contaminated marine sediments. *J Biotechnol*, 157:446-453.
80. Tiefbau-Berufsgenossenschaft (1996). Merkblatt über den Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen bei der Bodensanierung. pp 1-50.
81. Eriksson M, Sodersten E, Yu Z, Dalhammar G, Mohn W (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl Environ Microbiol*, 69(1):275-284.
82. Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59:143-152.

83. Chakrabarty AM (1986). Genetic engineering and problems of environmental pollution. *Bio/Technology*, 8:515-530.
84. Cases I, De Lorenzo V (2005). Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *Int Microbiol*, 8:213-222.
85. Samanta SK, Singh OV, Jain RK (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol*, 20:243-248.
86. Diaz E (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol*, 7:173-180.
87. Decreto legislativo 3 aprile 2006 n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006.
88. Saylor GS, Ripp S (2000). Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr Op Biotechnol*, 11:286-289.
89. European Agency for Safety and Health at Work (2007). Expert forecast on Emerging Biological Risks related to Occupational Safety and Health. *European Risk Observatory Report 3*, pp. 1-145.
90. ICOH Committee on Organic Dust (1997). Endotoxin in the environment: a criteria document. *Int J Occup Environ Health*, 3(suppl.):S1-48.
91. Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg*, 47(3):187-200.
92. Pietrangeli B (2008). Il rischio biologico nei luoghi di lavoro: priorità di ricerca per la valutazione del rischio. *Prevenzione Oggi*, ISPEL, 4 (1):60-74.
93. Merrell DS, Butler SM, Qadri F, Dolganov NA, Alam A, Cohen MB, Calderwood SB, Camilli A (2002). Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature*, 417:642-645.
94. Faruque SM, Biswas K, Udden SM, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB, Mekalonus JJ (2006). Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci, USA* 103: 6350-6355.
95. Teunis PFM, Chappell CL, Okhuysen PC (2002). *Cryptosporidium* dose reponse studies: variation between isolates. *Risk Analysis*, 22 (1): 175-183.
96. Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Okabe N (2000). Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Disease*, 181(2 suppl):S270-S274.
97. Donlan RM, Costerton JW (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinical relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15:167-193.
98. O'Brien SJ, Bhopal RS (1993). Legionnaires' disease: the infective dose paradox. *The Lancet*, 342: 5-6.

99. Mampel J, Spirig T, Weber SS, Haangensen JA, Molin S, Hilbi H (2006). Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol*, 72:2885-2895.
100. Radon K (2006). The two sides of the endotoxin coin. *Occup Environ Med*, 63 (1):73-78.
101. Radon K, Ehrenstein V, Praml G, Nowak D (2004). Childhood visits to animal buildings and atopic diseases in adulthood. An age-dependent relationship. *Am J Ind Med*, 46(4):349-356.
102. Liu AH, Redmon J (2001). Endotoxin: friend or foe? *Allergy Asthma Proc*, 22 (6): 337-340.
103. Vandebulcke L, Bachert C, Van CP, Claeys S (2006). The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol*, 139 (2): 159-165.
104. Eduard W, Omenaas E, Bakke PS, Douwes J, Heederik D (2004). Atopic and non-atopic asthma in a farming and a general population. *Am J. Ind Med*, 46(4): 396-399.
105. Heederik D, Sigsgaard T (2005). Respiratory allergy in agricultural workers: recent developments. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5(2): 129-134.
106. Song BJ, Liu AH (2003). Metropolitan endotoxin exposure, allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3( 5): 331-335.
107. Lenters V, Basinas I, Beane-Freeman L, Boffetta P, Checkoway H, Coggon D, Portengen L, Sim M, Wouters IM, Heederik D, Vermeulen R (2010). Endotoxin exposure and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis of the published literature on agriculture and cotton textile workers. *Cancer Causes Control*, 21(4): 523-555.
108. Segal S, Hill AVS (2003). Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol*, 11(9):445-448.
109. Chapman SJ, Hill AV (2012). Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet*, 13(3):175-188.
110. Pietrangeli B, Venanzetti F (2004). Rischio da esposizione ad agenti biologici nel settore agrozootecnico. *Ambiente Risorse Salute*, 99:44-49.
111. Ministero del lavoro e della previdenza sociale (2008). Nuove tabelle delle malattie professionali nell'industria e nell'agricoltura. Decreto 9 aprile 2008. *Gazzetta Ufficiale* n. 169 del 21 luglio 2008.
112. Kryda MJ, Emanuel DA (1986). Farmer's lung disease and other hypersensitivity pneumonitides. In: Sarosi GA, Davies SF (Eds): *Fungal Diseases of the Lung*. New York: Grune & Stratton.

113. Lacey J, Crook B (1988). Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann Occup Hyg*, 32: 515-533.
114. Lewis DM, Romeo PA, Olenchock SA (1986). Prevalence of IgE antibodies to grain and grain dust in grain elevator workers. *Environ Health Perspect*, 66: 149-153.
115. Milanowski J, Dutkiewicz J, Potoczna H, Kus L, Urbanowicz B (1998). Allergic alveolitis among agricultural workers in eastern Poland: a study of 20 cases. *Ann Agric Environ Med*, 5: 31-43.
116. Burrell R (1995). Immunotoxic reactions in the agricultural environment. *Ann Agric Environ Med*, 2 :11-20.
117. Clapp WD, Becker S, Quay J, Watt JL, Thorne PS, Frees KL, Zhang X, Koren HS, Lux CR, Schwartz DA (1994). Grain dust induced air flow obstruction and inflammation of the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*, 150: 611-617.
118. Deetz DC, Jagielo PJ, Queen TJ, Thorne PS, Bleuer SA, Schwartz DA (1997). The kinetics of grain dust-induced inflammation of the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*, 155: 254-259.
119. Sorenson WG, Shahan TA, Lewis DM (1994). Activation of alveolar macrophages by conidia of common fungi associated with organic dust toxic syndrome. In: Samson RA, Flannigan B, Flannigan ME, Verhoeff AP, Adan OCG, Hoekstra ES (Eds): *Health implication of Fungi in Indoor Environments*: 325-343. Elsevier, Amsterdam.
120. Schwartz DA, Thorne PS, Yagla SJ, Burmeister LF, Olenchock SA, Watt JL, Quinn TJ (1995). The role of endotoxin in grain dust induced lung disease. *Am J respire Crit Care Med*, 152:603-608.
121. Von Essen S, Fryek J, Nowakowski B, Wampler M (1999). Respiratory symptoms and farming practices in farmers associated with an acute febrile illness after organic dust exposure. *Chest*, 116: 1452- 1458.
122. Fogelmark B, Goto H, Itoh W, Kojima T, Mizuno DI, Rylander R, Sugawara I, Suzuki M, Tanaka S, Yuasa K (1991). First glucan inhalation toxicity workshop report 4/91. Committee on Organic Dusts, ICOH, Goteborg, 1-20.
123. Rylander R, Williams DL, McWilliams A, Yuasa K, Goto H, Peterson Y (1993). Second Glucan Inhalation Toxicity Workshop. Report 1/93. Committee on Organic Dusts, ICOH, Goteborg.
124. Eduard W, Douwes J, Mehl R, Heederik D, Melbostad E (2001). Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms. *Occup Environ Med*, 58:113-118.
125. Bunger J, Antlauf-Lammers M, Schulz TG, Westphal GA, Muller MM, Ruhnau P, Hallier E (2000). Health complaints and immunological markers of exposure to

- bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occup Environ Med*, 57:458-464.
126. Radon K, Danuser B, Iversen M, Monso E, Weber C, Hartung J, Donham KJ, Palmgren U, Nowak D (2002). Air contaminants in different european farming environments. *Ann Agric Environ Med*, 9:41-48.
  127. Jensen PA, Todd WF, Hart ME, Leroy M, O'Brien R (1993). Evaluation and control of worker exposure to fungi in a beet sugar refinery. *Am Ind Hyg Assoc J*, 54: 742-748.
  128. Eduard W, Sandven P, Levy F (1993). Serum IgG antibodies to mold spores in two Norwegian sawmill populations: relationship to respiratory and other work-related symptoms. *Am J Ind Med*, 24:207-222.
  129. Castellan RM, Olenchock SA, Hankinson JL (1984). Acute bronchoconstriction induced by cotton dust: dose-related responses to endotoxin and other dust factors. *Ann Intern Med*, 101:157-163.
  130. Vinzents P, Nielsen BH (1992). Variations in exposures to dust and endotoxin in Danish piggeries. *Am J Hyg Assoc*, 53:237-241.
  131. Haglund P, Rylander R (1984). Exposure to cotton dust in an experimental card-room. *Br J Ind Med*, 41:340-345.
  132. Olenchock SA (1994). Health effects of biological agents: the role of endotoxins. *Appl Occup Environ Hyg*, 9(1): 62-64.
  133. INAIL (2009). Il punto sull'andamento infortunistico 2009. *Rivista degli infortuni e delle malattie professionali*.
  134. Beckett WS (1994). The epidemiology of occupational asthma. *Eur Respir J*, 7:161.
  135. Cartier A (1994). Definition and diagnosis of occupational asthma. *Eur Respir J*, 7:153.
  136. Previdi M et al. (1998). Allergopatie respiratorie professionali: monitoraggio ambientale, aeroallergeni, prevenzione. *Med Lav*, 89: 481.
  137. Romano C (1995). Fattori di rischio ambientali e meccanismi patogenetici. In *Asma Professionale*. Pavia: Ed. Moscato G.
  138. Moses AE, Leibergal M, Rahav G, Perovansky M, Or R, Shapiro M (1995). *Aeromonas hydrophila* myonecrosis accompanying mucromycosis five years after bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14(3): 237-240.
  139. Thorn J, Beijer L, Rylander R (2002). Work related symptoms among sewage workers: a nationwide survey in Sweden. *Occup Environ Med*, 59:562-566.
  140. Thorn J, Kerekes E (2001). Health effects among employees in sewage treatment plants: a literature survey. *Am J Ind Med*, 40:170-179.

141. Mulloy KB (2001). Sewage workers: toxic hazards and health effects. *Occup Med*, 16:23-38.
142. Scarlett-Kranz JM, Babish JG, Srickland D (1987). Health among municipal sewage and water treatment workers. *Toxicol Ind Health*, 3:311-319.
143. Clark SC (1987). Potential and actual biological related health risks of wastewater industry employment. *J Water Pollut Contr Fed*, 59:999-1008.
144. Mattsby I, Rylander R (1978). Clinical and immunological findings in workers exposed to sewage dust. *J Occup Med*, 20:690-692.
145. Nethercott JR, Holness DL (1988). Health status of a group of sewage treatment workers in Toronto, Canada. *Am Ind Hyg Assoc J*, 49:346-350.
146. Zuskin E, Mustafbegovic J, Schacter EN (1993). Respiratory function in sewage workers. *Am J Ind Med*, 23:751-761.
147. Friis L, Norbäck D, Edling C (1999). Self-reported asthma and respiratory symptoms in sewage workers. *J Occup Health*, 41:87-90.
148. Rylander R (1999). Health effects among workers in sewage treatment plants. *J Occup Env Med*, 56:354-357.
149. Melbostadt E, Eduard W, Skogstad A (1994). Exposure to bacterial aerosols and work-related symptoms in sewage workers. *Am J Ind Med*, 25:59-63.
150. Gregersen P, Grunnet K, Uldum SA (1999). Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry. *Scand J Work Environ Health*, 25:291-295.
151. Rylander R, Anderson K, Belin L, Berglund G, Bergstrom R, Manson LA, Lundholm M, Mattsby I (1976). Sewage worker's syndrome. *Lancet*, 28: 478.
152. Prazmo Z, Krysinska E, Skorska C, Sitkowska J, Cholewa G, Dutkiewicz J (2003). Exposure to bioaerosols in a municipal sewage treatment plant. *Ann Agric Environ Med*, 10: 241-248.
153. Clark CS, Linneman CC (1986). The use of serum antibody as a means to determine infection from exposure to wastewater and refuse. *CRC Rev Environ Contr*, 16: 305-328.
154. Lundholm M, Rylander R (1983). Work-related symptoms among sewage workers. *Br J Ind Med*, 40:325-329.
155. Friis L, Agréus L, Edling C (1998). Abdominal symptoms among sewage workers. *Occup Med*, 48:251-253.
156. Schlosser O, Roudot-Thoraval F (1995). Exposition professionnelle aux eaux usées et risque d'hépatite virale A. *Arch Mal Prof*, 56 (1):23-27.
157. Skinhoj P, Blain Hollinger F, Hovind-Hougen K, et al.(1981). Infectious liver diseases in three groups of Copenhagen workers: correlation of hepatitis A infection to sewage exposure. *Arch Environ Health*, 36:139-143.

158. Shakespeare A, Poole J (1993). Sewage workers and hepatitis A. *Occup Health*, 45:364-366.
159. Heng BH, Goh KT, Doraisingham S, Quek GH (1994). Prevalence of hepatitis A virus infection among sewage workers in Singapore. *Epidemiol Infect*, 113:121-128.
160. Brugha R, Heptonstall J, Farrington P, et al. (1998). Risk of hepatitis A infection in sewage workers. *Occup Environ Med*, 55:567-569.
161. De Serres G, Levesque B, Higgins R (1995). Need for vaccination of sewer workers against leptospirosis and hepatitis A. *Occup Environ Med*, 52:505-509.
162. eap BJ, McCulloch ML (1991). Giardiasis and occupational risk in sewage workers. *Lancet*, 338:1404-1405.
163. Srivastava VK (1986). Parasitic infestations in sewage farm workers. *Ind J Parasitol*, 10: 193-194.
164. Rowan NJ (2004). Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: quo vadis? *Trends Food Sci Technol*, 15:462-467.
165. Pommepuy M, Butin M, Derrien A, Gourmelon M, Colwell RR, Cormier M (1996). Retention of enteropathogenicity by viable but non-culturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl Environ Microbiol* 62:4621-4626.
166. Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol*, 3:817-820.
167. Eduard W, Douwes J, Mehl R, Heederik D, Melbostad E (2001). Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms. *Occup Environ Med*, 58:113-118.
168. Bunger J, Antlauf-Lammers M, Schulz TG, Westphal GA, Muller MM, Ruhnau P, Hallier E. (2000). Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occup Environ Med*, 57:458-464.
169. Stetzenbach LD, Buttner MP, Cruz P (2004). Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Op Microbiol*, 15: 170-174.
170. Nielsen M, Wurtz H, Nielsen BH, Breum NO, Poulsen OM (1997). Relationship between different bioaerosol parameters sampled from the breathing zone of waste collectors. Identification of the most important parameters. *Ann Agric Med*, 4:81-85.
171. Wu Z, Wang X, Blomquist G (2002). Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi. *J Environ. Monit*, 4:377-382.

172. Wu Z, Tsumura Y, Blomquist G, Wang X. (2003). 18S rRNA gene variation among common airborne fungi and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Appl Environ Microb*, 69:5389-5397.
173. Kurtzman CP, Robnett CJ (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73:331-371.
174. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50:1351-1371.
175. Davolos D, Pietrangeli B (2006). Molecular analysis on the fungi isolated from bioaerosols. In: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology 2006 (VAAM). Jena (Germany), 19-22 March 2006, p.182.







