



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'**

**Valutazione della contaminazione microbiologica  
di fanghi di depurazione di reflui civili:  
problemi legati alle metodiche di analisi**

**Lucia Bonadonna, Mauro Latini, Irene Di Girolamo, Massimo Ottaviani**

*Laboratorio di Igiene Ambientale*

Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Valutazione della contaminazione microbiologica di fanghi di depurazione di reflui civili: problemi legati alle metodiche di analisi.**

Lucia Bonadonna, Mauro Latini, Irene Di Girolamo, Massimo Ottaviani  
Set 94, 84 p. Rapporti ISTISAN 94/17 (in italiano)

Si riportano i risultati ottenuti dall'analisi microbiologica di campioni di fanghi di reflui civili. Particolare attenzione è stata rivolta alla ricerca del patogeno *Salmonella* in considerazione della recente normativa relativa all'utilizzazione dei fanghi in agricoltura che ne richiede il rilevamento quantitativo (D.L. n. 99 del 27 gennaio 1992). Sono messe a confronto differenti metodiche analitiche e le diverse procedure sono valutate al fine di individuare quella che, in misura migliore, può costituire un punto di riferimento per l'esecuzione dei controlli richiesti dalla legislazione.

*Parole chiave:* Fanghi di depurazione, *Salmonella*.

Istituto Superiore di Sanità, Rome (Italy)

**Evaluation of microbiological contamination of civil sewage sludges: problems due to analytical methods.**

Lucia Bonadonna, Mauro Latini, Irene Di Girolamo, Massimo Ottaviani  
Sep 94, 84 p. Rapporti ISTISAN 94/17 (in Italian)

The results obtained by comparing different methodologies for the microbiological analysis of sewage sludges are presented. Most attention is addressed to the pathogen *Salmonella* in view of the quantitative enumeration requested in the recent Italian legislation on the use of sludges in agriculture (Italian Legislative Decree n. 99, January 27, 1992). In light of the results, the analytical procedures are considered and discussed with the aim of providing a point of reference for the microbiological control of sludges.

*Key words:* Sludges, *Salmonella*.

## Indice

Introduzione.....	1
1. Trattamento dei fanghi.....	7
2. Aspetti igienici dei fanghi di depurazione.....	19
2.1 Batteri.....	26
2.2 Virus.....	31
2.3 Parassiti.....	37
2.3.1 Protozoi.....	37
2.3.2 Elminti.....	39
3. Problematiche legate alle tecniche di analisi dei fanghi....	45
4. Materiali e metodi.....	49
4.1 Tecniche di analisi dei fanghi per la ricerca di <i>Salmonella</i> .....	51
4.2 Tecniche di analisi dei fanghi per la ricerca dei coliformi fecali.....	59
5. Risultati e discussione.....	61
6. Conclusioni.....	71
Bibliografia.....	75

## **Introduzione**

I processi di trattamento dei liquami forniscono come prodotto di risulta un fango, a diverso grado di disidratazione, in cui vengono a concentrarsi gli inquinanti presenti nei liquami: composti inorganici, sostanze organiche anche difficilmente biodegradabili, metalli pesanti e microrganismi.

La destinazione finale dei fanghi biologici derivanti dai trattamenti delle acque reflue costituisce un problema, destinato ad acquistare dimensioni sempre più preoccupanti e quindi urgente e prioritario poiché strettamente correlato a problematiche sanitarie ed ambientali. La sua soluzione può derivare da opzioni diverse: messa in discarica, incenerimento, dispersione in mare e riutilizzo agricolo che comunque possono rappresentare risposte più o meno vantaggiose dal punto di vista tecnologico, ambientale ed economico.

Il recupero dei fanghi per le pratiche agricole come ammendanti, fertilizzanti o correttori del suolo è probabilmente una tra le più concrete soluzioni di smaltimento di questi prodotti.

L'aspetto più positivo di questa pratica è da ricercarsi nella possibilità di chiudere un ciclo biochimico e geochimico, in un'ottica di conservazione e di recupero di risorse, riportando al suolo quegli elementi che l'agricoltura sottrae in modo spesso irrazionale.

In Italia le modalità di attuazione di questa pratica vengono regolamentate dal Decreto Legislativo del 27 gennaio 1992 n° 99 [1] che ha recepito la Direttiva C.E.E. 86/278 del giugno 1986 [2].

Il Decreto stabilisce le norme relative all'uso dei fanghi in agricoltura in considerazione del rischio per la salute dell'uomo e della salvaguardia dell'ambiente.

Infatti, nella normativa italiana vengono determinate alcune caratteristiche dei fanghi che possono essere destinati ad uso agricolo, precludendo in tale ambito l'uso dei fanghi tal quali in quanto, a fronte dei vantaggiosi aspetti economici e gestionali ne esistono, per contro, altri la cui importanza è tale da ridimensionare e talvolta impedire la pratica del reimpiego in agricoltura. Dalla considerazione di ciò, la normativa ha tenuto conto sia della potenzialità fertilizzante dei fanghi di depurazione sia di quella inquinante ed ha stabilito quando e in che termini questa ultima deve diventare limitante per la prima. Pertanto, l'utilizzazione agricola dei

fanghi richiede attente valutazioni preliminari ed accurati controlli analitici del prodotto, come del terreno.

Nonostante la rilevanza del problema gli studi esaustivi relativi alla determinazione della qualità dei fanghi di depurazione non sono tuttavia così numerosi ed esaurienti. La maggior parte di essi ha approfondito l'esame delle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche, con particolare riguardo alla presenza di metalli pesanti. Infatti, essi, quali elementi tossici, possono costituire un rischio elevato per l'uomo e per gli animali caratterizzandosi per il loro bioaccumulo ed inoltre possono avere anche effetti di fitotossicità nelle piante [3].

Tuttavia, non meno importante è lo studio delle caratteristiche microbiologiche dei fanghi di depurazione che concentrano, insieme agli altri inquinanti contenuti nei liquami, tutti i microrganismi in essi presenti. Gran parte dei microrganismi rientra nella comune flora batterica intestinale che, sversata con gli scarichi nei reflui, si concentra nei fanghi. Inoltre ad essa è associato un certo numero, pur se variabile, di microrganismi patogeni o potenzialmente tali. La loro frequenza e il loro rilevamento nei fanghi dipendono da diversi fattori, non ultimo il numero di microrganismi eliminati da individui ammalati o sani (portatori sani), la loro

quantità, la lunghezza del periodo di eliminazione, la loro resistenza all'ambiente esterno e anche la sensibilità delle tecniche per il loro isolamento.

Più numerosi risultano invece in letteratura gli studi effettuati sulla qualità delle acque reflue, sia perché è questa una matrice di più facile analisi, sia perché le problematiche relative sono di più facile soluzione e inoltre le normative che ne stabiliscono le caratteristiche risalgono a tempi meno recenti (Legge 10 maggio 1976, n°319) [4]. Le ultime norme sono quelle riportate nella recentissima Legge 5 gennaio 1994 n. 36 che reca disposizioni in materia di risorse idriche [5].

In Italia alcuni gruppi di lavoro si occupano dello studio della qualità microbiologica dei fanghi derivanti dai trattamenti dei liquami. In particolar modo l'Istituto Superiore di Sanità sta svolgendo, ormai da alcuni anni, ricerche in questo ambito [6]. Fin dalle prime fasi delle ricerche è stato evidenziato che indagini più approfondite e specifiche sarebbero state necessarie per quanto riguarda i metodi di analisi di questa particolare matrice.

A conferma di ciò diversi autori [7] hanno evidenziato come la caratteristica strutturale dei fanghi possa influenzare i risultati di analisi volte al rilevamento dei microrganismi in essi presenti. Infatti sono state osservate differenze marcate



nei valori ottenuti da analisi batteriologiche se preventivamente veniva o meno effettuato un trattamento con mezzi diversi del campione.

I diversi risultati rilevati potrebbero essere attribuiti alla caratteristica propria delle particelle di cui è composto il fango. Esse infatti possono costituire, oltre che una fonte di nutrimento, anche un sito di adesione per i microrganismi che vengono in esse segregati. Mezzi diversamente energici, quali agitazione meccanica, omogeneizzazione e sonicazione potrebbero permettere la disgregazione delle particelle di fango con conseguente rilascio, in misura diversa, dei microrganismi in esse aggregati. Sulla base di quanto sopra esposto è stata svolta una ricerca su fanghi di depurazione di reflui civili. A tale scopo sono stati esaminati campioni di fango derivati da due impianti. I campioni sono stati sottoposti a diverse tecniche di trattamento e diversi sono stati i terreni colturali per l'isolamento dei microrganismi ricercati.

Le analisi microbiologiche hanno riguardato la ricerca dei coliformi fecali, quali indicatori di contaminazione fecale e del patogeno *Salmonella*. Particolare attenzione è stata rivolta al rilevamento di questo microrganismo anche in considerazione della già citata Normativa relativa

all'utilizzazione dei fanghi per pratiche agricole (D.L. n°99, 1992) [1] che ne richiede il rilevamento quantitativo.

L'individuazione di procedure analitiche, specifiche, selettive e ripetibili può costituire un punto di riferimento per l'esecuzione di controlli mirati ad una determinazione più accurata della qualità di fanghi eventualmente da destinare ad uso agricolo.

## **1. Trattamento dei fanghi**

Attualmente in Italia vengono prodotti circa 6 milioni di tonnellate di fango/anno che derivano tuttavia solo dal trattamento del 60% delle acque di rifiuto civili [8] il restante 40% non subisce trattamento.

L'incremento costante della produzione di fanghi derivanti dalla depurazione delle acque contribuisce come conseguenza ad aumentare la necessità di soluzioni che portino al loro riutilizzo e/o smaltimento.

È evidente che la via del loro recupero è auspicabile per motivi economici ed energetici e si contrappone o si integra positivamente a quella più costosa e laboriosa dello smaltimento.

L'impiego agricolo dei prodotti della depurazione, da usare come concimi ed ammendanti competitivi agli altri prodotti offerti dal mercato, è possibile comunque solo a seguito di una corretta gestione e valutazione del problema. In questo ambito pertanto la via del recupero deve tenere in debita considerazione due aspetti di base: la potenzialità fertilizzante e la potenzialità inquinante.

L'uso dei fanghi in agricoltura è una pratica diffusa in diverse aree del mondo: Stati Uniti, Messico, Perù, Sud Africa, India e Nord Europa.

Un fango perché possa essere usato con vantaggio in agricoltura deve trovarsi in uno stadio avanzato del processo di stabilizzazione, deve cioè possedere caratteristiche igienico-sanitarie accettabili e deve avere subito la decomposizione della maggior parte delle sostanze organiche. La stabilizzazione o digestione ha anche lo scopo di ridurre nei fanghi la presenza di germi patogeni e l'emanazione di odori molesti [9].

Diversi sono i metodi impiegati per effettuare la stabilizzazione dei fanghi; la scelta del sistema è in funzione delle potenzialità dell'impianto e del sistema di smaltimento finale. In figura 1 è riportato uno schema riassuntivo dei trattamenti cui si possono sottoporre i fanghi di depurazione prima dello smaltimento.

La stabilizzazione del fango può essere raggiunta con risultati più o meno soddisfacenti adottando diverse strategie che possono suddividersi in 4 differenti gruppi: stabilizzazione biologica, stabilizzazione termica, stabilizzazione chimica e stabilizzazione fisica.

La stabilizzazione biologica avviene ad opera di microrganismi che utilizzano le sostanze organiche biodegradabili e può essere attuata con la digestione anaerobica mesofila e quella aerobica.

La digestione anaerobica è svolta da una flora batterica anaerobica, dopo aver introdotto il fango in contenitori chiusi mantenuti a temperature tra i 30° C e i 36° C, privi di ossigeno e per un tempo di detenzione di almeno 20 giorni.

La digestione anaerobica mesofila non è in grado da sola di fornire un fango con sufficienti garanzie igieniche. Infatti, molte sostanze, come i detergenti sintetici, gli idrocarburi clorurati, i vari composti organici e metallici possono inibire il processo. Pertanto le densità di *Salmonella* vengono ridotte da  $10^5$ /L a  $10^3$ /L, mentre è ancora più basso il rendimento per *Escherichia coli* (da  $10^9$ /L a  $10^7$ /L) [10]. Inoltre, il prodotto finale ha un forte contenuto di BOD a causa della grande quantità di materia organica iniziale. La digestione anaerobica richiede tempi più lunghi rispetto ai processi aerobi ed è meno completa.

La digestione aerobica è applicata specialmente per stabilizzare fanghi secondari e/o fanghi prodotti da piccoli impianti. Il processo è condotto in vasche aerate del tipo di quelle a fanghi attivi e risente in misura minore, rispetto al

processo anaerobio, dell'azione di eventuali sostanze inibenti. Ha lo svantaggio di richiedere un elevato consumo di energia sebbene i tempi di trattamento siano molto ridotti rispetto al processo anaerobio.

L'efficienza del processo è funzione del tipo di fango e il trattamento deve essere integrato da una successiva fase d'igienizzazione.

Il processo di stabilizzazione termica avviene con il calore e può essere attuato mediante pastorizzazione o essiccamento termico.

La pastorizzazione del fango sembra attualmente il metodo più sicuro per ridurre la carica dei patogeni, ma l'applicazione pratica di questo processo è limitata sia da difficoltà tecniche sia da costi elevati. Il processo di pastorizzazione viene effettuato alla temperatura di 70° C per tempi di contatto definiti (generalmente 30 minuti). Nel fango mantenuto a questa temperatura per i tempi indicati, molte forme patogene vengono distrutte (Tabella 1).

Il trattamento di essiccamento termico consente di raggiungere la stabilizzazione del fango. Si ottiene spargendo i fanghi su un letto di sfere di plastica (in modo da favorire un'elevata superficie di contatto tra i fanghi da essiccare e

l'aria) e sottoponendoli ad una corrente di aria calda e secca (80-150° C) per circa 60 minuti. Il fango stabilizzato contiene il 10-40% di acqua: il prodotto così ottenuto può essere stoccato per lungo tempo senza pericoli di ricontaminazione. Tuttavia il costo per l'essiccamento è talmente elevato che il sistema non è applicato se non in casi particolari, quali la necessità di recuperare materiale secco e fertilizzante.

La stabilizzazione chimica è un processo che viene effettuato con l'uso di sostanze chimiche.

Può essere attuata con l'aggiunta di calce. Il trattamento è integrativo e si usa generalmente associato alla post pastorizzazione. Consiste nel mescolare calce viva in polvere nel pastorizzatore in quantità tale da ottenere un fango con valori di pH intorno a 10 [11]. Il sistema è di scarsa efficienza in quanto, mentre vengono inibite la crescita microbica e lo sviluppo di odori molesti, resta inalterato il contenuto di sostanze biodegradabili. L'efficienza del trattamento chimico aumenta invece se al fango viene addizionato cloro sotto forma di ipoclorito di sodio o di calcio, o cloro gassoso. In questo caso si verifica anche

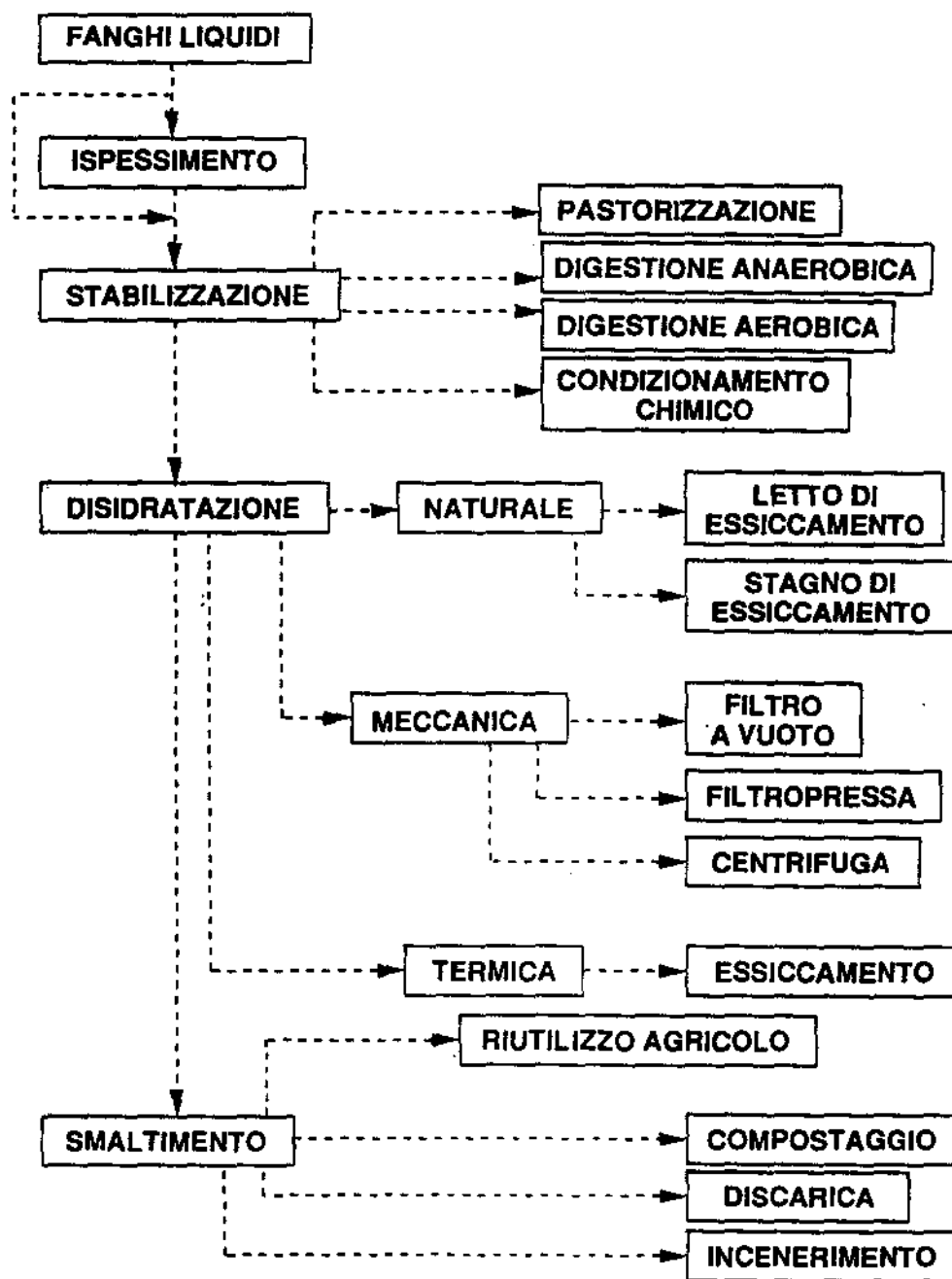


Figura 1. Schema dei possibili trattamenti dei fanghi.



l'ossidazione delle sostanze organiche biodegradabili. Tuttavia il costo del processo è elevato.

La stabilizzazione fisica assicura la distruzione dei microrganismi. Il trattamento viene effettuato con radiazioni  $\gamma$  e  $\beta$ . I fanghi all'interno di un reattore vengono bombardati e la sorgente radioattiva si applica a valle di un digestore. L'efficienza è elevata e il trattamento è in grado di abbattere di un fattore 6 le enterobatteriacee contenute in 1 mL di fango [12]. Per la scarsa diffusione e gli elevati costi il sistema deve considerarsi sperimentale e adottato solo da impianti pilota.

Un trattamento particolarmente indicato per i fanghi di origine organica è il compostaggio, un processo biologico che consiste nella decomposizione aerobica della frazione organica in una sostanza simile all'humus, il "compost". Il compost viene usato in agricoltura, poiché la sua frazione più utile, l'humus, svolge funzione ammendante (migliorando la struttura del suolo) e fertilizzante.

Tra le varie fasi del processo quella termofila è la più importante: vi intervengono microrganismi, soprattutto batteri, che permettono, in seguito all'esotermicità delle reazioni biochimiche che svolgono, un notevole aumento di

temperatura (fino a circa 70° C) che assicura l'eliminazione della maggior parte degli organismi patogeni e dei parassiti [13].

È opportuno avviare al compostaggio solo le tipologie di rifiuti idonee ad essere trasformate, ossia i rifiuti solidi urbani (RSU), in particolare quelli domestici, la carta e i prodotti a base cellulosica, i rifiuti agricoli e i fanghi di depurazione di origine organica. È indicato sottoporre a compostaggio sia i fanghi grezzi, sia quelli già stabilizzati, eventualmente miscelati con la frazione organica dei RSU. Infatti, mentre i fanghi sono ricchi di sostanze azotate e nutrienti fosfatici, i secondi hanno elevate concentrazioni di sostanze carboniose.

Tra i metodi di trattamento dei fanghi, il compostaggio è uno dei più corretti dal punto di vista ambientale, in quanto permette di reinserire la componente organica dei rifiuti nei cicli naturali. Il compost di buona qualità si presta vantaggiosamente per l'impiego in agricoltura perché è inodore, stabilizzato e sufficientemente dotato di macronutrienti, oligoelementi e ricco di sostanze organiche, quindi particolarmente indicato per i suoli agrari italiani poveri di humus.

Tabella 1. Temperature e tempi di abbattimento per alcuni microrganismi ottenuti con il processo di pastorizzazione dei fanghi.

ORGANISMO	TEMPERATURE e TEMPI DI ABBATTIMENTO
<i>Salmonella typhi</i>	non cresce sopra i 46° C; muore entro 30' tra 50-60° C
<i>Salmonella spp</i>	muore entro 1 ora a 56° C e entro 15-20' a 60° C
<i>Shigella spp</i>	muore entro 1 ora a 55° C
<i>Escherichia coli</i>	muore entro 1 ora a 55° C e entro 15-20' a 60° C
<i>Entamoeba histolytica</i>	muore a 68° C
<i>Taenia saginata</i>	muore entro 5' a 71° C
<i>Trichinella spiralis</i> (larve)	muore a 62-72° C
<i>Necator americanus</i>	muore entro 50' a 45° C
<i>Brucella abortus-suis</i>	muore entro 3' a 61° C
<i>Staphylococcus aureus</i>	muore entro 10' a 50° C
<i>Streptococcus pyogenes</i>	muore entro 10' a 54° C
<i>Mycobacterium</i>	
<i>tuberculosis hominis</i>	muore entro 15-20' a 66° C
<i>Mycobacterium diphtheriae</i>	muore entro 45' a 55° C

La decomposizione della sostanza organica e la riduzione di microrganismi patogeni dai fanghi può essere ulteriormente operata con l'uso di lombrichi, tramite il processo denominato "vermi-composting". L'azione dei lombrichi si esplica principalmente riducendo le densità dei Coliformi fecali in tempi da 2 a 8 mesi a seconda delle caratteristiche di partenza del fango. L'efficacia del processo si manifesta anche per i Coliformi totali che da concentrazioni di  $10^6/g$  nei fanghi di partenza si possono ridurre a valori intorno a  $10^3-10^4/g$ ; il trattamento risulta nondimeno ancora più valido nei riguardi dei Clostridi solfito riduttori che vengono ridotti di 3 unità logaritmiche [14].

Il fango può comunque essere smaltito, concetto che viene spesso erroneamente sovrapposto a quello di riciclo. Lo smaltimento implica l'eliminazione di sostanze che non possono o per le quali non è economicamente conveniente trovare una collocazione diversa. In questi casi si effettua un trattamento di incenerimento che è utilizzato soprattutto nel caso di fanghi che contengono alte concentrazioni di metalli tossici e che pertanto non possono essere altrimenti utilizzati.

I fanghi, prodotto del trattamento dei reflui, comunque igienizzati per un eventuale recupero, contengono ancora una percentuale molto elevata di acqua: i fanghi di sedimentazione

sono ancora per il 95% circa saturi di acqua, mentre i fanghi attivi ne contengono il 98-99%. Comunque, in funzione dell'impiego che si vuole fare del fango, si possono effettuare trattamenti di disidratazione che consentono di ridurre la quantità di acqua presente [15].

Con la disidratazione si può ottenere un fango sotto forma palabile (disidratazione poco spinta, condotta fino ad un tenore di acqua intorno all'80-84%) o sotto forma friabile (disidratazione portata fino ad ottenere un contenuto di acqua compreso tra 50-80%).

Il fango disidratato, in questo modo, può essere più facilmente interrato, portato in discarica e utilizzato, previa stabilizzazione, in agricoltura.

I sistemi di disidratazione impiegati più comunemente sono quelli che utilizzano apparecchiature meccaniche, quali filtri rotativi, filtropresse e nastropresse: i fanghi ottenuti contengono comunque ancora il 65-80% di acqua in funzione della tipologia del fango trattato. Risultano infatti mediamente disidratabili i fanghi da reflui civili, in cui si possono raggiungere tenori in secco del 50-55%; sono invece più difficilmente disidratabili i fanghi industriali e i fanghi urbani digeriti in maniera insufficiente (tenore in secco del 30-35%) [15].

Bisogna comunque considerare che i costi per la disidratazione aumentano più che proporzionalmente in funzione della disidratazione ottenuta e pertanto la scelta del trattamento si basa spesso su fattori economici.

## **2. Aspetti igienici dei fanghi di depurazione**

La densità e le specie microbiche che si ritrovano nei reflui non trattati hanno una variabilità molto ampia: sono in stretta relazione sia al coefficiente di diluizione del liquame in rapporto alla dotazione idrica pro-capite, sia all'apporto derivante delle feci. Se si considera che il consumo idrico per usi civili, peraltro in costante aumento, oscilla tra i 70-80 L giorno/abitante per i piccoli agglomerati urbani (fino a 5000 abitanti) e i 1000 L giorno/abitante, per i grandi agglomerati, si può calcolare teoricamente che la concentrazione di microrganismi nelle acque reflue può variare di circa 10 volte [16].

Di conseguenza, anche nei fanghi si riscontrano ampie fluttuazioni delle densità di microrganismi presenti. Tuttavia, le loro quantità finali, siano essi batteri, virus o parassiti, dipendono essenzialmente dal tipo di trattamento cui viene soggetto il fango prima dello smaltimento. L'impiego dei fanghi in agricoltura si pone come valida alternativa a più costose forme di smaltimento con il vantaggio di rendere più economica e razionale la fertilizzazione dei suoli. Tuttavia

tale pratica agricola è applicabile solo quando siano assicurate precise garanzie per la salute dell'uomo e per la salvaguardia dell'ambiente.

La presenza di microrganismi patogeni rende necessario, pertanto, che la determinazione della qualità igienico-sanitaria dei fanghi, soprattutto se utilizzati come risorsa agronomica, venga effettuata anche tramite la ricerca dei patogeni.

È necessario quindi che il problema sanitario connesso al riutilizzo dei fanghi non si limiti al controllo degli usuali indicatori di contaminazione fecale (coliformi e streptococchi). Essi sono da considerare quali parametri indicativi e la loro concentrazione può, nei fanghi, risultare molto elevata. A questo proposito è stato verificato che, a fronte di una densità variabile di batteri di origine enterica tra  $10^9$ - $10^{10}$  in 100 mL di liquame, la concentrazione degli stessi microrganismi nei fanghi freschi può oscillare tra  $10^9$ - $10^{13}$ /100 mL [17], con densità di *Escherichia coli* intorno a  $10^9$ /L [10].

Nei processi a fanghi attivi, condotti su liquame chiarificato ed operanti in condizioni ottimali, l'abbattimento dei batteri patogeni e degli indicatori, può raggiungere livelli compresi tra il 95 e il 99% rispettivamente [18, 19].



Livelli diversi di rimozione dei microrganismi possono essere ottenuti con i trattamenti di digestione anaerobica che risultano meno completi ed efficaci e che permettono di produrre un abbattimento di circa il 90% dei microrganismi [20].

La presenza di batteri, virus e parassiti (protozoi e metazoi) rimasti comunque intrappolati nei fanghi, può rappresentare un rischio sanitario e una limitazione per le pratiche di recupero in agricoltura.

Il rischio è legato alla contaminazione di colture vegetali che possono, attraverso la catena alimentare, essere veicolo di trasmissione di malattie, sia per l'uomo, sia per gli animali (Fig.2).

Nondimeno, la pratica di spargimento sul suolo agricolo, e non, può anche contribuire alla contaminazione di acque sotterranee. Infatti, il dilavamento dei suoli apportato dalle acque piovane, in terreni fessurati e permeabili, può trasportare il carico inquinante nelle falde idriche, sebbene gran parte dei microrganismi vengono intercettati nei primi 5 cm di terreno [21].

Ancora più facilmente possono essere contaminate le acque superficiali in cui vengono a riversarsi le acque che

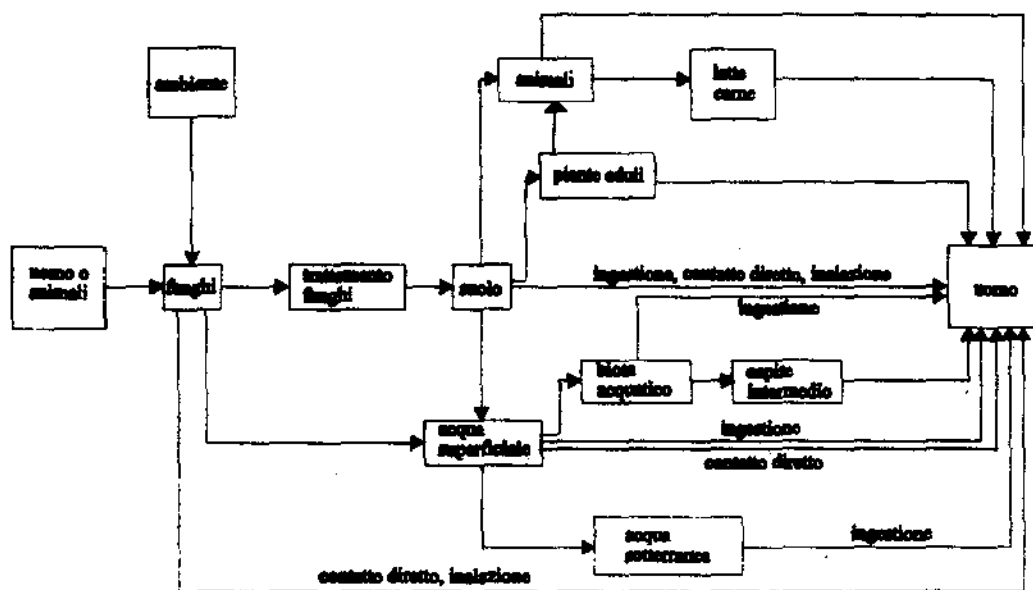


Figura 2. Potenziale trasmissione dei patogeni all'uomo attraverso i fanghi di depurazione.

scorrono sulla superficie del suolo trasportando sostanze inquinanti e contaminanti biologici.

È stata ipotizzata l'esistenza di una correlazione tra la diffusione dei fanghi sul suolo e l'insorgenza di malattie: parassitosi da *Ascaris*, *Ancylostoma* e *Taenia* tra gli

elminti, *Entamoeba* e *Giardia* tra i protozoi. Tuttavia anche virus e batteri patogeni, diffusi così nell'ambiente, potrebbero essere agenti eziologici di infezioni a diffusione fecale-orale [22].

Il rischio è correlato strettamente alla presenza delle forme di vita più resistenti: cisti di protozoi e uova di elminti. Tuttavia, anche i batteri possono trovare condizioni favorevoli per la loro sopravvivenza e, per alcuni di essi, per la loro moltiplicazione.

In particolare, patogeni come *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* possono raggiungere nei fanghi elevati potenziali infettivi. Analogamente, anche batteri potenzialmente patogeni (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp) possono trovare le condizioni adatte al loro sviluppo in presenza di sostanza organica biodegradabile.

Bisogna comunque considerare che, mentre il rischio sperimentale è calcolato in base al titolo e alla capacità di sopravvivenza del patogeno, per valutare quello reale si devono tenere in considerazione diversi fattori. Livelli socio-economici, standard igienici e grado d'immunizzazione della popolazione, periodo di latenza del patogeno, tempo di sopravvivenza e sua capacità di replicarsi nell'ambiente, dose infettante possono concorrere a valutare il rischio reale.

Risultati ottenuti da studi svolti in Israele [23] hanno portato alla individuazione di tre categorie di rischio per le infezioni collegate alla contaminazione di acque reflue (tabella 2).

La prima categoria comprende infezioni ad alto rischio, da Elminti, per i quali è sufficiente una bassa dose infettante per indurre la malattia e contro le quali la popolazione non ha immunità.

Le infezioni a rischio medio sono comprese nella seconda categoria e includono le patologie batteriche. Alcune delle infezioni possono risultare asintomatiche e caratterizzarsi per il fenomeno dei portatori sani.

Nella terza categoria, in cui vengono indicate le infezioni a basso rischio, sono inclusi i virus, più comunemente diffusi per contatto diretto.

In generale, la protezione immunitaria svolge un ruolo di un certo rilievo solo per le infezioni virali e per alcune infezioni batteriche, mentre non è rilevante per le parassitosi.

**Tabella 2. Classi di rischio in relazione agli agenti patogeni**

<b>PATOGENI</b>	<b>DOSE INFETTANTE</b>	<b>CATEGORIA DI RISCHIO</b>
<b><u>ELMINTI</u></b>		
<i>Ascaris</i>		
<i>Trichuris</i>	BASSA	ALTO
<i>Ancylostoma</i>		
<i>Taenia</i>		
<b><u>BATTERI ENTERICI</u></b>		
<i>Salmonella</i>		
<i>Shigella</i>	MEDIO-ALTA	MEDIO
<i>Vibrio</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<b><u>VIRUS</u></b>		
Epatite A		
<i>Rotavirus</i>	BASSA	BASSO

## 2.1 Batteri

Limitatamente alla componente batterica, nei fanghi, in particolar modo se adibiti ad uso agricolo, il maggior rischio in campo sanitario sembra derivare principalmente dalla presenza di *Salmonella* [20].

Per definire tuttavia il rischio di contrarre infezioni da *Salmonella* è di fondamentale importanza considerare la dose infettiva.

Per stabilire il valore della DMI (Dose Minima Infettante) si deve tener conto di diversi fattori, quali l'età, le condizioni fisiche dell'ospite, nonché i sierotipi di *Salmonella* coinvolti.

Quest'ultimo punto risulta di una certa rilevanza se si considera che in letteratura i dati relativi al numero di *Salmonelle* richiesto per instaurare l'infezione sono molto variabili.

Per quanto riguarda la *S. typhi* è riconosciuto che essa è molto più diffusa nella popolazione di quanto si possa desumere in base ai dati di incidenza della malattia clinicamente accertata. È stato calcolato che in una popolazione esposta ad alto grado di infezione, soltanto una piccola porzione sviluppa la malattia (meno del 20% degli infettati) [24].

In uno studio effettuato su volontari a cui venivano somministrate dosi orali di *S. typhi*, si è verificato che nel 7% dei casi, con l'assunzione di  $10^3$  organismi infettanti, non si manifestavano i sintomi dell'infezione e che lo stesso si verificava nel 5% degli stessi volontari quando veniva somministrata una dose di  $10^{12}$  organismi infettanti. Tuttavia il 50% del totale si ammalava dopo ingestione di  $10^7$  organismi [24].

Più in generale, da studi svolti durante epidemie di salmonellosi è stato valutato che la malattia può essere contratta a densità variabili tra  $10^4$  -  $10^8$  organismi infettanti ingeriti [25].

È stato riportato che gastroenteriti da *Salmonella eastburne* si manifestavano in adulti e bambini quando le cellule infettanti erano comprese tra 1 e 100/g di cibo contaminato. Ciononostante, in alcuni episodi di salmonellosi legati all'ingestione di *S. cubana*, è stato calcolato che erano sufficienti 15000 cellule infettanti per generare la patologia [25].

Nei fanghi, *Salmonella* viene sempre più spesso rilevata anche in relazione all'aumento, costantemente osservato, del numero di portatori sani nella popolazione.

In Svizzera, dove i fanghi vengono comunemente usati come fertilizzanti in agricoltura, studi recenti hanno evidenziato quanto questa pratica possa favorire la diffusione di salmonelle nell'ambiente [26]. Su 370 campioni di fango non igienizzato, 339 (il 97%) contenevano *Salmonella* la cui densità era compresa tra 2 e 5 milioni per litro di fango non disidratato.

I processi di trattamento del fango sono in grado di ridurre il numero di salmonelle, come di tutti i microrganismi presenti. Tuttavia i diversi trattamenti sono in grado di produrre differenti risultati. A questo proposito è stato evidenziato che la digestione anaerobica mesofila non è in grado di dare un fango con sufficienti garanzie igieniche: la densità di salmonella si può ridurre da  $10^5$  a  $10^3$  per litro di fango [10]. Risultati migliori si ottengono con la digestione aerobica mesofila che permette di ridurre di tre unità logaritmiche il numero di *Salmonella* [20].

Nondimeno, è da sottolineare come il fattore che maggiormente influenza la sopravvivenza dei microrganismi durante la digestione del fango sia la temperatura. Pertanto si verifica che con la sola digestione aerobica a freddo si ha una diminuzione di *Salmonella* di un fattore 10 [12].



Un trattamento particolarmente efficace per i fanghi di origine organica è, come già stato detto, il compostaggio che consiste nella decomposizione aerobica della frazione organica attraverso varie fasi. Durante il processo la fase termofila è la più importante: un aumento della temperatura (fino a circa 70° C), legato alla presenza di batteri specifici, assicura l'eliminazione della maggior parte dei patogeni e dei parassiti. Tuttavia, è possibile che il compost, prodotto dal trattamento, una volta stoccato, possa subire contaminazioni successive. Infatti, in un'indagine condotta negli USA in diversi impianti di compostaggio, è stato ancora ritrovata salmonella dopo la fine del processo [27]. Nonostante la stabilizzazione del fango, la rimozione di *Salmonella* può essere solo temporanea perché essa è in grado di moltiplicarsi anche al di fuori del tratto intestinale dell'uomo e degli animali, in ambiente favorevole. Inoltre, è stato osservato che se reinoculate le salmonelle possono facilmente moltiplicarsi favorite dalla eliminazione, durante il compostaggio, di microrganismi competitori ed antagonisti [28].

Le pratiche di spargimento dei fanghi sul suolo, se da una parte possono contribuire al miglioramento delle rese agricole, dall'altra, in base alle considerazioni sopra esposte,

possono apportare all'ambiente microrganismi che si caratterizzano anche per la loro valenza sanitaria.

Tuttavia bisogna considerare che la vitalità dei batteri, una volta diffusi con i fanghi sul terreno, può essere influenzata da diversi fattori. Temperatura, pH, presenza di sostanze tossiche, capacità di ritenzione idrica del suolo, contenuto di sostanza organica, umidità, radiazione solare, antibiosi e rapporti di competizione, antagonismo con la microflora del suolo possono agire più o meno marcatamente sui diversi microrganismi. I batteri, apportati al suolo con il fango, vengono infatti ad inserirsi in un equilibrio preesistente non sempre ad essi favorevole.

I tempi di sopravvivenza sono di solito maggiori in terreni neutri o alcalini e comunque umidi. Inoltre, i periodi piovosi e le basse temperature possono favorire il mantenimento della vitalità batterica. È stato ripetutamente osservato che ad alte temperature, in un ambito in cui i valori massimi non siano letali, i tempi di sopravvivenza sono nettamente inferiori, probabilmente in funzione dell'aumento della competizione con la flora autoctona antagonista. Del resto, la temperatura elevata accelera il metabolismo microbico, provocando un aumento nel ritmo di crescita in condizioni ottimali. Si osserva così che nelle stagioni fredde

le densità sono basse, ma i batteri presenti mantengono la capacità di svilupparsi, mentre nelle stagioni calde viene raggiunta velocemente la fase di letalità, in cui il tasso di crescita è negativo.

In particolare, la capacità di sopravvivenza di *Salmonella*, in suoli trattati con fanghi, dipende prevalentemente da fattori climatici: nel periodo invernale il tempo di sopravvivenza è stato calcolato tra i 12 e i 46 giorni sulla superficie del suolo. Negli strati più profondi i tempi si allungano (70 giorni). In estate, *Salmonella* scompare in 15 giorni, ma i tempi si riducono a 2 giorni se le giornate sono di sole pieno [29]. Differenze nei tempi di sopravvivenza si riscontrano anche in funzione dei diversi sierotipi [30]: sono stati segnalati tempi variabili tra 15 giorni e 280 giorni. In tabella 3 sono riportati i tempi di sopravvivenza di alcuni microrganismi nell'ambiente.

## 2.2 Virus

La caratterizzazione dei liquami e dei fanghi provenienti da impianti di trattamento è stata principalmente orientata allo studio degli aspetti batteriologici; scarsi infatti risultano i

dati sperimentali relativi alla presenza, soprattutto nei fanghi, della componente virale. Ciò deriva principalmente dalla difficoltà di mettere a punto tecniche per il rilevamento dei virus, sebbene negli ultimi anni siano stati fatti progressi in questo senso. Infatti i maggiori problemi analitici derivano proprio dalla particolare caratteristica dei virus che si adsorbono alle micelle organiche in modo piuttosto stabile. Nei fanghi la parte organica è quella dominante, pertanto campioni di questa tipologia risultano particolarmente difficili da analizzare per il rilevamento dei virus.

Un individuo può eliminare 100 o più differenti virus negli scarichi, una concentrazione bassa se comparata a quella dei batteri. Infatti il rapporto tra virus enterici e coliformi nelle feci umane è di 1:65000 [31]. Tuttavia, bisogna considerare che una sola unità virale può provocare la malattia e che quindi la diffusione di questi patogeni nell'ambiente riveste particolare importanza.

I virus che riguardano la patologia umana e che possono essere ritrovati nei fanghi appartengono ai gruppi degli *Enterovirus* (Poliovirus, Echovirus, Coxackievirus ed Epatite A), *Adenovirus*, *Reovirus*, *Rotavirus*, *Parvovirus* e *Coronavirus*.

**Tabella 3. Tempi di sopravvivenza per diversi microrganismi nell'ambiente.**

<b>ORGANISMO</b>	<b>SUPPORTO</b>	<b>TEMPO DI SOPRAVVIVENZA (GIORNI)</b>
	suolo	38
Coliformi	verdure	35
	marcite	6 - 34
<i>Salmonella</i> sp.	suolo	15 - 280
	frutta e verdura	3 - 49
<i>Salmonella typhi</i>	suolo	1 - 120
	frutta e verdura	1 - 68
	marcite	42
<i>Shigella</i>	verdure	2 - 10
	acqua putrida	160
<i>Bacillus tuberculosis</i>	suolo	180
	marcite	10 - 49
<i>Entamoeba histolytica</i>	suolo	6 - 8
	verdure	1 - 3
Cisti	acqua	8 - 40
Enterovirus	suolo	8
	verdure	4 - 6
Uova di ascaridi	suolo	oltre 7 anni
	frutta e verdura	27 - 35

Secondo Kelly e Sandersen [32] la quantità dei virus nei liquami varia tra  $10^2$  e  $10^3$  U.F.P./L (Unità Formanti Placca).

Dati diversi vengono riportati da altri autori [7] che hanno dimostrato che la concentrazione può oscillare tra 80 unità/100 mL nei mesi invernali e 60 unità/100 mL nei mesi estivi.

È comunque noto che le densità possono variare in funzione delle condizioni igieniche della popolazione.

I trattamenti di depurazione dei reflui sono in grado di eliminare buona parte delle particelle virali presenti. È accertato che il 95-99% dei virus, grazie alla loro capacità di adsorbimento ai solidi sospesi, sedimentano con i fanghi primari [6]. La pratica della clorazione non sembra del tutto idonea per l'eliminazione dei virus, mentre più efficiente risulterebbe l'ozonizzazione che con 0,7 mg/L di ozono è in grado di rimuovere completamente il Poliovirus (>99,9%).

Con la disidratazione dei fanghi si assiste ad una graduale perdita di infettività che risulta irreversibile a causa della degradazione delle singole unità virali.

Alcuni autori [33] hanno riportato che il 44 - 53% dei campioni di fango analizzati, sottoposti al trattamento di digestione anaerobica e non disidratati risultava positivo. Tuttavia uno studio effettuato presso un impianto di

trattamento di reflui civili a Roma ha evidenziato, in campioni di fango disidratato in uscita dalle nastropresse, la presenza di particelle virali in 1 solo campione su 12 con valori di 4900 U.F.P./Kg di fango [6].

Sul terreno irrigato con reflui o sottoposto a concimazione con fanghi di depurazione i virus possono essere temporaneamente immobilizzati per adsorbimento, possono muoversi verticalmente, approfondendosi nel terreno, e orizzontalmente. In questo modo possono arrivare a contaminare falde e corpi idrici superficiali. Studi svolti in Israele [34] hanno dimostrato che i virus possono essere ritrovati a 100 metri di distanza dal punto di spargimento di fanghi. L'adsorbimento alle particelle solide è strettamente correlato al tipo di virus coinvolto e al pH del terreno; è generalmente maggiore a pH neutri.

I meccanismi che regolano l'adesione delle particelle virali non sono ancora bene chiariti, ma il processo è sicuramente importante per quanto riguarda l'infettività a breve e lungo termine. Ciononostante, l'adsorbimento comporta, da parte del suolo, una pura sottrazione delle unità virali che sono invece ridotte realmente in funzione della temperatura.

A +5° C l'inattivazione dei virus sul terreno è minore del 90% per Poliovirus, Echovirus e virus dell'Epatite A; a 25° C gli stessi si riducono tuttavia circa del 99,9% [35].

È stato stimato che la sopravvivenza dei virus sul suolo sia mediamente, in funzione del virus considerato, di almeno 100 giorni [36]. Nei fanghi sparsi sul terreno varia in funzione della stagione: il  $T_{90}^*$  è inferiore ad 1 giorno nei mesi estivi e di circa 56 giorni in quelli invernali.

Esistono difficoltà oggettive per quanto riguarda gli studi epidemiologici relativi al rischio legato alla diffusione dei virus nell'ambiente a mezzo di acque reflue. Ancora più difficile risulta stabilire una relazione tra malattia di origine virale e uso di fanghi per pratiche agricole. Tuttavia studi effettuati in Israele [23] sulla possibilità di contrarre malattie virali in seguito alla contaminazione ambientale provocata dall'uso di acque reflue pongono i virus nella categoria dei patogeni a basso rischio, in quanto per questi microrganismi il contatto diretto tra individui risulta essere la forma più comune di diffusione. Inoltre sembra piuttosto elevata la possibilità di acquisire immunità specifica verso i virus. Ne è esempio un'indagine epidemiologica effettuata negli U.S.A. [37] in cui con l'applicazione di fanghi a terreni agricoli non

---

\* Il  $T_{90}$  esprime il tempo necessario per riscontrare la riduzione del 90 % dei microrganismi.



si verificava nessuna differenza significativa nella frequenza delle infezioni virali, mentre veniva riscontrato un alto titolo anticorpale per il Coxackievirus B5 negli operatori che manipolavano il materiale che erano quindi particolarmente esposti.

### **2.3 Parassiti**

Il rischio biologico associato allo smaltimento sul terreno di fanghi e liquami provenienti da impianti di depurazione è legato soprattutto ad alcune specie parassite di Protozoi e di Elminti.

#### **2.3.1 Protozoi**

I Protozoi rilevati con maggiore frequenza nei fanghi appartengono ai generi *Giardia* ed *Entamoeba*. Alcuni Autori segnalano inoltre la presenza di *Balantidium coli* [38] e di coccidi [39].

I Protozoi vengono rilevati nei fanghi e nei liquami come cisti, forme di resistenza che permettono a questi

microorganismi di superare condizioni ambientali sfavorevoli, e che rappresentano di norma lo stadio responsabile della maggior parte delle nuove infezioni.

Tuttavia le cisti di Protozoi sembrano essere molto sensibili ad alcuni fattori ambientali quali temperatura e/o umidità e all'essiccamento in generale. Studi effettuati sulle acque di scarico negli U.S.A. hanno riscontrato concentrazioni elevate di *Giardia lamblia* in acque grezze (da  $9,6 \cdot 10^3$  a  $2,4 \cdot 10^5$  cisti/L); sono state inoltre evidenziate densità più ridotte di *Entamoeba histolytica* in acque non trattate (4 cisti/L) [40].

Durante i processi di trattamento delle acque, accanto ad una riduzione del 99% dei batteri indicatori, è stato osservato un abbattimento del 54% delle cisti di *Entamoeba histolytica* [40]. In particolare la digestione anaerobia dei fanghi sembra essere efficiente per ridurre le densità.

I tempi di sopravvivenza dei Protozoi sul suolo sono relativamente ridotti: non si ritrovano più cisti vitali dopo 10 giorni di permanenza sul terreno.

Nonostante la dose infettante delle cisti di Protozoi sia bassa, la patogenicità è altamente variabile anche da ceppo a ceppo, e in base alla risposta individuale; spesso le infezioni sono asintomatiche.

I dati epidemiologici si riferiscono soprattutto alla trasmissione di amebiasi da vegetali irrigati con acque reflue non trattate. Questa patologia ha distribuzione cosmopolita e si stima che circa 500 milioni di persone ne siano colpite. La sua incidenza in Italia è molto esigua. Molto più rilevante è invece nel nostro Paese la presenza della giardiasi: in Lombardia la *Giardia* risulta essere il Protozoo intestinale più frequentemente isolato nei laboratori ospedalieri [41] e studi effettuati nelle scuole elementari della Bassa bergamasca nel 1980 hanno mostrato una prevalenza del 7%.

### 2.3.2 Elminti

Gli studi epidemiologici più recenti hanno evidenziato che gli Elminti rappresentano senza dubbio il problema maggiore in relazione ad una corretta gestione dei reflui e dei fanghi. Ciò dipende principalmente da due fattori: elevata resistenza ambientale degli stadi infettanti e bassa dose infettante necessaria a contrarre le diverse elmintiasi.

Organismi appartenenti a questo gruppo, che non ha in realtà un preciso significato zoologico e che comprende specie parassite rientranti nei phyla dei Platelminti, dei

Nematodi, e degli Acantocefali, sono frequentemente rilevate nei fanghi e nei liquami.

Le specie di Elminti parassiti rilevate nei liquami sono numerose e sono elencate in tabella 4.

Alcuni Autori hanno evidenziato che il maggiore rischio sanitario correlato alla presenza di Elminti è relativo a 2 generi in particolare: *Taenia* ed *Ascaris* [22]. Ciononostante è ipotizzabile che, in seguito al perfezionamento delle tecniche di analisi e all'approfondimento degli studi epidemiologici, possono essere evidenziati rischi per la salute umana anche a carico di altri taxa di Elminti. Ad esempio il rischio di trasmissione di anchilostomiasi attraverso lo smaltimento agricolo dei fanghi è ancora da approfondire. Questa patologia era ampiamente diffusa in Italia fino a 30 anni fa; focolai di anchilostomiasi da *Necator americanus* sono stati segnalati di recente in Veneto tra gli orticoltori. Inoltre, poiché la fecalizzazione del terreno è considerata la principale via di trasmissione [42], si può facilmente prevedere che accurati studi sull'argomento metteranno in evidenza, per questo parassita, la possibilità dell'esistenza di rischi sanitari connessi al riutilizzo dei fanghi e dei liquami.

Per quanto riguarda *Taenia*, il rischio biologico sembra piuttosto limitato. Infatti, da una parte è noto che le fasi

larvali di *T. saginata*, non parassitano l'uomo, dall'altra, sebbene *T. solium* sia un parassita più pericoloso del primo, sembra verificato che la contaminazione di uova di provenienza ambientale sia accidentale. Comunque la sua incidenza in Italia è attualmente molto ridotta (meno di 5 casi annui segnalati sull'intero territorio italiano) [43] e non si può parlare di effettivo rischio sanitario.

I risultati di alcuni studi effettuati in Gran Bretagna hanno dimostrato tuttavia che in seguito allo spargimento dei fanghi sul suolo possono verificarsi infestazioni di *Taenia* a carico del bestiame [44]. Comunque la sua presenza su pascoli trattati con fango contaminato non sembra più rilevabile dopo 17-18 settimane dallo spargimento.

I maggiori problemi connessi alla diffusione delle elmintiasi attraverso lo smaltimento di fanghi sui terreni agricoli sono legati alla presenza di uova di *A. lumbricoides*. Il rischio sanitario connesso alla presenza di uova di questo parassita nei fanghi è soprattutto legato alle proprietà adesive di queste ultime. Nel caso di coltivazioni orticole trattate con fanghi o con liquami infatti, un normale lavaggio non è sufficiente a rimuovere le eventuali uova fissate sulle verdure. *A. lumbricoides* ha diffusione cosmopolita e infesta ogni anno 1 miliardo e 300 milioni di persone. L'incidenza

**Tabella 4.** Specie di Elminti rilevate nei liquami con i loro più probabili ospiti.

ORGANISMI	OSPITE USUALE
<b>NEMATODI</b>	
<i>Ascaris</i> spp.	uomo, maiale
<i>Toxascaris</i> spp.	cane, gatto
<i>Toxocara</i> spp.	cane, gatto
<i>Trichuris</i> spp.	cane, gatto, uomo, bovini
<i>Capillaria</i> spp.	cane, volpe, bovini
<i>Enterobius</i> <i>vermicularis</i>	uomo
<i>Ancylostoma</i> spp.	uomo, maiale, cane, gatto, volpe
<i>Necator</i> spp.	uomo, maiale, cane, gatto, volpe
<i>Cooperia</i> spp.	pecora, capra, cervo, bovini
<i>Haemonchus</i> spp.	pecora, capra, cervo, bovini
<i>Trichostrongylus</i> spp.	uomo, cavallo, pecora, bovini, maiale, cervo
<b>CESTODI</b>	
<i>Taenia</i> spp.	cane, gatto, roditori, uomo
<i>Hymenolepis</i> spp.	ratto, topo, uomo
<i>Echinococcus</i> spp.	cane, pecora, uomo

dell'ascariasi in Italia è diminuita in modo drastico negli ultimi decenni, ma attualmente è comunque stimata attorno ai 2000 casi annui.

La densità e la varietà di specie di Elminti nelle acque di scarico dipendono primariamente dal contributo della popolazione umana ed animale alla diffusione dei parassiti. Pertanto i dati in letteratura sono piuttosto variabili. Sono stati calcolati valori di 66 uova/L in acqua non trattata [45]; in particolare nelle acque in entrata ad un impianto sono state evidenziate 15-27 uova/L di *Ascaris*. Poiché le uova sono più dense dell'acqua, la maggior parte si depositano durante il processo di sedimentazione che permette quindi di ottenere nell'effluente un numero più basso di uova. Come conseguenza nel fango vanno a concentrarsi uova di Elminti in densità elevate. Nei fanghi il quantitativo medio di uova di parassiti è stato stimato tra 300 - 400 uova/L di fango pompabile, con 60 uova/L nei liquami all'origine.

La pastorizzazione effettuata a 60° C per 30 minuti distrugge le uova di *Ascaris*; non così efficiente risulta la digestione anaerobia [46] e anche la disidratazione e gli sbalzi di temperatura non sono del tutto efficaci.

Le uova di Elminti possono sopravvivere per lunghi periodi di tempo sul terreno. In condizioni favorevoli di

umidità, temperatura ed insolazione, *Ascaris* sp., *Trichiuris* sp. e *Toxocara* sp. possono rimanere vitali per diversi anni [47]. Secondo alcuni autori le uova di *Ascaris* sono in grado di mantenere la loro vitalità sul suolo per 5-6 anni; il tempo medio di sopravvivenza è tuttavia valutato tra i 17 e i 270 giorni [40]. Comunque i tempi di sopravvivenza dipendono dalle condizioni stagionali: si abbassano alle alte temperature e contemporaneamente aumenta la richiesta di umidità minima necessaria per la conservazione della vitalità. A temperature elevate (22-30° C) le uova sono uccise rapidamente anche da una parziale essiccazione.



### **3. Problematiche legate alle tecniche di analisi dei fanghi**

I fanghi derivati dai trattamenti di depurazione dei reflui concentrano, come già detto, tutti i microrganismi presenti nel liquame trattato.

Pertanto la concentrazione microbica, se da una parte è legata alla mancanza di processi di trattamento completamente efficaci, in grado di eliminare tutti i microrganismi presenti, dall'altra è proprio il risultato dell'affinità e dell'associazione dei microrganismi tra loro e ai solidi sospesi nei reflui.

È stato più volte sottolineato che durante i trattamenti delle acque reflue, la complessa costituzione dei fanghi è legata alla formazione dei fiocchi che derivano dall'adesione dei microrganismi tra loro e dal "coagulo" sulle particelle in sospensione. Il meccanismo di aggregazione batterica e di adesione in fiocchi non è stato ancora completamente compreso, sebbene sembra intervengano sulla fase iniziale forze deboli di Van der Waal [48].

Prove effettuate su campioni di fango digerito anaerobicamente hanno evidenziato che il 78% dei coliformi

totali e fecali fanno parte della componente solida e che solo il 22% si ritrovano nella fase liquida. I valori sono ancora più elevati, 95% e 5% rispettivamente, se si considerano fanghi trattati aerobicamente [49].

Da ciò si evidenzia che i fanghi di depurazione costituiscono una matrice particolarmente difficile da analizzare, se si vuole enumerare, con la maggior precisione possibile, il numero di microrganismi che si vanno a ricercare. Infatti, proprio a causa della stretta associazione che si viene a costituire durante la formazione dei fiocchi sorgono difficoltà per separare, liberandoli dai "coaguli", i singoli microrganismi. L'eventualità che aderiscano tra loro può portare ad errori di valutazione in quanto dall'analisi si possono ottenere sottostime del numero di microrganismi realmente presenti.

In letteratura scarsi risultano gli studi sulla valutazione comparativa di metodiche di analisi dei fanghi di depurazione.

Il metodo analitico convenzionale e più comunemente usato per l'esame dei fanghi si basa sull'allestimento di una sospensione-diluizione in cui a un quantitativo noto di fango si aggiunge proporzionalmente un certo volume di diluente.

Dopo una moderata agitazione manuale o su piastra magnetica, il campione può essere sottoposto all'analisi microbiologica vera e propria [50].

Tuttavia esistono metodi, la cui pratica non è sempre di uso comune, che comportano trattamenti preliminari più energici. Tutti i trattamenti, comunque necessitano, prima dell'esecuzione, dell'allestimento di una sospensione a titolo noto di fango.

I metodi chimici utilizzano generalmente detergenti ed enzimi, ma sembrano poco efficaci se utilizzati per la conta di microrganismi vitali da rilevare con i tradizionali metodi di coltura [51].

I metodi meccanici sembrano invece più efficaci. L'omogeneizzazione sembra possa far rilasciare nel mezzo liquido (il diluente) un maggior numero di microrganismi che possono poi crescere e quindi essere evidenziati sui terreni colturali. Esperimenti effettuati con apparecchiature ad ultrasuoni hanno dimostrato anche l'efficacia di questo tipo di trattamento. L'estrazione dei microrganismi dai fiocchi di fango può essere significativamente aumentata, sebbene sia stato evidenziato che tempi di sonicazione troppo lunghi possano danneggiare le cellule vitali, riducendo quindi la validità del trattamento. Infatti, generalmente il numero dei

microrganismi rilevati diminuisce quando il tempo di sonicazione supera i 30 secondi. Prove effettuate su campioni di fango hanno tuttavia anche evidenziato la possibilità che metodi diversi possano agire differientemente in base al tipo di microrganismo ricercato [52].

#### 4. Materiali e metodi

Nelle corso di circa un anno di studio sono stati esaminati campioni di fanghi di risulta provenienti da due diversi impianti di depurazione a fanghi attivi (Impianto A e Impianto B). Nell'impianto A la depurazione delle acque è basata sul processo a fanghi attivi ed i fanghi di risulta subiscono un processo di digestione anaerobia seguito da una disidratazione meccanica. Anche nell'impianto B viene effettuato un analogo tipo di trattamento dei reflui ma la digestione di fanghi si svolge con un processo di tipo aerobico.

Nei fanghi, prelevati mensilmente, sono stati ricercati il patogeno *Salmonella* e, quali indicatori di contaminazione fecale, i coliformi fecali.

I campioni di fango raccolti sono stati trasportati in laboratorio in contenitori refrigerati e analizzati entro le 24 h dal prelievo.

100 gr. di fango sono stati diluiti (1:10) in acqua fisiologica tamponata ( $K_2HPO_4$ , 3 g/L,  $KH_2PO_4$ , 1 g/L, NaCl 8.5 g/L; pH 7,2) e la sospensione sottoposta ad agitazione su piastra magnetica per 15 minuti al fine di renderla omogenea.

La sospensione ottenuta è stata quindi suddivisa in beute in 4 aliquote uguali (100 mL/beuta).

Successivamente le 4 sospensioni sono state sottoposte a trattamenti diversi:

- agitazione meccanica su agitatore elettromagnetico (Magneturre, PBI Int. S.p.a., Italia) per 15 minuti a 500 giri/minuto (agitazione);

- omogeneizzazione con omogeneizzatore (Omni - Mixer, Sorval, Inc., USA) a lame rotanti (triturazione). La velocità era controllata con un reostato regolato a 115 V per 10 sec. Durante la omogeneizzazione la sospensione è stata tenuta in bagno di ghiaccio;

- omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico (Potter-Overhead, Wheaton Instr., USA) a una potenza di 120 W per 15 secondi (omogeneizzazione). Durante il trattamento la sospensione è stata mantenuta in bagno di ghiaccio;

- sonicazione con disintegratore ad ultrasuoni (Sonic Dismembrator T 300, IPI Int., Inc., USA) con sonda da 19 mm di diametro a una potenza di 150 W applicando 2 impulsi di 5 secondi ciascuno (sonicazione). Durante la sonicazione la sospensione è stata tenuta in bagno di ghiaccio.

Successivamente ai fanghi così trattati è stato aggiunto Na pirofosfato ad una concentrazione finale di 0,01% (w/v). Tutti i trattamenti sono stati effettuati contemporaneamente, entro un tempo massimo di 20 minuti.

Dalle sospensioni, così diversamente trattate, sono state quindi allestite diluizioni per lo svolgimento delle analisi microbiologiche.

#### **4.1 Tecniche di analisi dei fanghi per la ricerca di *Salmonella***

Il rilevamento di *Salmonella* è stato effettuato quantitativamente con il metodo dei tubi multipli (MPN). La tecnica di analisi utilizzata si è svolta in fasi successive: prearricchimento, arricchimento, isolamento, prove di conferma, identificazione e prove sierologiche.

##### **Procedimento**

##### **Prearricchimento.**

Volumi scalari di 10, 1 e 0.1 mL della diluizione del fango sono stati insemensati in 3 serie di 3 tubi ciascuna

contenenti acqua peptonata (Peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7,2) distribuita in tubi (10 mL/tubo) alla concentrazione 2x, 1x e 1x. L'incubazione è stata effettuata per 24 h a  $36\pm 1^\circ$  C in bagnomaria.

#### Arricchimento.

Da ciascun tubo di acqua peptonata è stato trasferito 1 mL della brodocoltura in un corrispondente tubo di brodo di arricchimento (10 mL/tubo). Tutte le operazioni sono state effettuate in conformità alle usuali regole di asepsi.

Per l'arricchimento sono stati utilizzati 2 substrati culturali diversi: il Selenite Cystine broth (BBL) e il Rappaport-Vassiliadis R 10 broth (Difco). I terreni, che si trovano in commercio in forma disidratata, si preparano secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Dopo l'inoculo dai tubi del prearricchimento nei tubi di brodo di arricchimento si è proceduto all'incubazione in bagnomaria, a  $37^\circ$  C per 24 + 24 h per il Selenite Cystine broth, a  $42^\circ$  C per 24 + 24 h per il Rappaport-Vassiliadis R 10 broth.



### Isolamento

Da ciascuno dei tubi dei brodi di arricchimento sono state eseguite due subcolture: la prima dopo 24 h di incubazione la seconda dopo 48 h.

Per l'isolamento sono stati utilizzati 2 substrati colturali agarizzati: l'Hektoen Enteric Agar (Oxoid) e il Rambach Agar (Merck). I terreni, che si trovano in commercio in forma disidratata, si preparano secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizzano. Si distribuiscono in piastre Petri e si lasciano solidificare.

Da ciascuno dei tubi di arricchimento, dopo le 24 e 48 h di incubazione, è stata prelevata un'ansata della brodocoltura ed è stata stemperata sulla superficie di ciascuno dei due terreni in piastra marcando sulla piastra la corrispondente diluizione nel tubo.

La lettura dei risultati è stata effettuata dopo 24 h di incubazione per entrambi i terreni. Sull'Hektoen Enteric Agar le colonie sospette appaiono verdi con o senza centro nero; sul Rambach Agar si presentano rosse.

### Prove di conferma

Tutte le colonie di presunta *Salmonella* sono state isolate su Agar Nutritivo (Oxoid) per verificarne la purezza. Il

terreno, che si trova in commercio in forma disidratata, si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si sterilizza a 121° C per 15 minuti e si distribuisce in piastre Petri.

Gli isolamenti, effettuati rispettando le usuali regole di asepsi, sono stati posti ad incubare a 37° C per 24 h. Le colonie cresciute sono state quindi verificate per la colorazione di Gram: le *Salmonelle* sono bacilli Gram negativi. Dopo avere individuato tra le diverse prove biochimiche usualmente utilizzate per l'identificazione di *Salmonella* quelle più idonee e significative per ottenere un primo orientamento diagnostico, ciascuna delle colonie cresciute è stata quindi saggiata parallelamente su terreni specifici.

Su Kligler Iron Agar (Oxoid) è stata effettuata la prova della fermentazione degli zuccheri. Il terreno, che si trova in commercio in forma disidratata, si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si distribuisce in tubi (10 mL/tubo). Si sterilizza a 121° C per 15 minuti e si lascia solidificare in posizione inclinata in modo da ottenere una superficie a becco di clarino. Le colonie sospette sono state trasferite sul terreno inoculando prima la parte cilindrica del becco di clarino e, quindi, strisciando con cura sull'intera

superficie inclinata. Come di seguito descritto le reazioni di acidificazione della parte inclinata e della estremità cilindrica del becco di clarino e l'osservazione della produzione di gas e  $H_2S$  consentono già un primo orientamento diagnostico. Tutte le *Salmonelle* (tranne la *S. typhi* che non produce gas) su Kligler Iron Agar producono una colorazione rossa (alcalina) del becco di clarino e gialla (acida) del cilindro con formazione di gas e produzione di  $H_2S$  (annerimento).

Contemporaneamente, per effettuare il test di decarbossilazione è stato utilizzato il substrato Lysine Iron Agar (BBL). Il terreno, che si trova in commercio in forma disidratata, si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si distribuisce in tubi (10 mL/tubo). Si sterilizza a  $121^\circ C$  per 12 minuti e si lascia solidificare in posizione inclinata in modo da ottenere una superficie a becco di clarino. Le colonie sospette sono state trasferite sul terreno inoculando prima la parte cilindrica del becco di clarino e, quindi, strisciando con cura sull'intera superficie inclinata. Tutte le *Salmonelle* su Lysine Iron Agar producono una colorazione porpora (alcalina) sia del becco di clarino, sia del cilindro con produzione di  $H_2S$  (annerimento).

Per l'evidenziazione dell'ureasi e della fenilalanina deaminasi è stato utilizzato il substrato Urea-phenylalanine Broth la cui composizione è la seguente:

---

Estratto di lievito	1	g
Solfato di ammonio	2	g
Cloruro di sodio	3	g
Fosfato di sodio	1,2	g
Fosfato diidrogeno di sodio	0,8	g
DL-fenilalanina	2	g
Acqua distillata	97	mL
pH 6,8 ± 0,2		

---

Dopo aver sciolto gli ingredienti di base al calore, il terreno si lascia raffreddare intorno ai 46° C e vi si aggiungono 5 g di urea e 3,5 mL di una soluzione di rosso fenolo. Il terreno completo è stato quindi sterilizzato per filtrazione. Al momento dell'uso il terreno è stato diluito 1:10 e distribuito in tubi (10 mL/tubo).

Dopo incubazione a 37°C per 24 h, la presenza di *Salmonella* è evidenziata dalla mancanza di cambiamento del colore del terreno. Lo sviluppo di un'area verde nel terreno,

dopo l'aggiunta di poche gocce di una soluzione di  $\text{FeCl}_3$  0,5M, è indicativa della presenza di *Proteus* e *Providencia*.

### Identificazione

Le colonie individuate come presunte salmonelle sono state quindi identificate a livello di genere tramite una serie di 30 prove biochimiche effettuate con l'apparecchiatura automatizzata Vitek 30 Jr (Vitek System).

### Espressione dei risultati

Il numero di salmonelle presenti in ciascun campione di fango è stato calcolato in base alla tabella dell'indice MPN ricavata applicando la formula di Thomas [52] e riportando il valore all'unità grammo tal quale.

Dal valore ottenuto è stato poi calcolato il numero di salmonelle per grammo di sostanza secca di fango con la seguente formula:

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

### Prove sierologiche

La tipizzazione è stata eseguita con antisieri specifici polivalenti e monovalenti (Bohering), distinguendo prima i gruppi mediante antisieri somatici e cimentando poi i ceppi con antisieri della I e II fase.

La colonia da saggiare, preventivamente cresciuta su Agar Nutritivo, è stata stemperata in una goccia di antisiero. La comparsa dell'agglutinazione è stata esaminata ad occhio nudo entro 1-2 minuti.

Per l'individuazione della specie si è fatto riferimento al manuale WHO [53].

#### **4.2 Tecniche di analisi dei fanghi per la ricerca dei coliformi fecali**

Il rilevamento dei coliformi fecali nei fanghi è stato effettuato quantitativamente con il metodo delle membrane filtranti [52] previa diluizione del fango e successivo trattamento, come descritto in precedenza.

Quale terreno di isolamento è stato utilizzato l'MFC Agar (Oxoid). Il terreno, che si trova in commercio in forma disidratata, si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizza e dopo dissoluzione della polvere in acqua distillata si aggiunge una soluzione (10 mL/L) di acido rosolico all'1% in NaOH 0,2 N. Si distribuisce in capsule Petri (15 mL/piastra) e si lascia solidificare.

Il rilevamento dei coliformi fecali è stato effettuato filtrando 1 mL della diluizione di fango prescelta attraverso membrane (Millipore) con pori di diametro 0,45  $\mu\text{m}$ . Ogni analisi è stata effettuata in doppio. Al termine del periodo di incubazione (24h a 44° C) si è proceduto al conteggio delle colonie: i coliformi fecali su questo terreno producono colonie blu.

Il numero di coliformi fecali è stato quindi riportato al valore dell'unità grammo tal quale ed è stata calcolata la

densità per grammo di sostanza secca, come descritto precedentemente.



## 5. Risultati e discussione

La tabella 5 riporta le percentuali di risultati negativi (*Salmonella* non rilevata) riscontrati in entrambi i gruppi di campioni (impianto A e B) distinguendo i dati in base ai trattamenti subiti dal fango prima dell'analisi microbiologica.

Le percentuali di negatività registrata sono state inoltre suddivise in base alle diverse combinazioni di terreni colturali ed ai diversi trattamenti cui sono stati sottoposti i fanghi prima dell'analisi (tabella 6).

In tabella 7 sono riportate le percentuali di risultati positivi calcolati in base al rilevamento effettuato sui terreni di isolamento dopo 24 e 48 ore di incubazione dei brodi di arricchimento.

In tabella 8 sono elencati i sierotipi di *Salmonella* isolati nei fanghi e le percentuali di rilevamento sul numero totale degli isolati.

Nelle tabelle 9 e 10 sono indicate le concentrazioni di coliformi fecali rilevate nei fanghi prelevati nei due impianti di depurazione, riferite a 1 g di sostanza secca.

I fanghi esaminati, così come sono stati caratterizzati sotto il profilo microbiologico, non sono risultati idonei all'uso agricolo. Infatti, le concentrazioni riscontrate per il

parametro *Salmonella* nei fanghi di entrambi gli impianti hanno raggiunto anche valori superiori a quelli stabiliti dalla legislazione [1].

L'analisi dei risultati ottenuti dalla ricerca di *Salmonella* nei campioni di fango degli impianti A e B ha messo comunque in evidenza l'esistenza di una variabilità dei dati dovuta principalmente alle tecniche operative di analisi del fango stesso. Può risultare significativo che i valori più bassi si ottengano prevalentemente dall'analisi del fango effettuata dopo il trattamento di agitazione. Tali risultati corrispondono, nell'analisi svolta con il metodo del numero più probabile (MPN), alla mancanza di rilevamento di colonie di *Salmonella*, che invece sono state spesso evidenziate, e successivamente confermate, quando si è operato con mezzi di trattamento più energici. Infatti per quanto riguarda alcuni campioni prelevati nell'impianto A, la presenza di *Salmonella* non sarebbe stata evidenziata se si fosse operato con il solo trattamento di agitazione. Pertanto dalle analisi effettuate sembra che i 3 metodi, alternativi al trattamento di agitazione, si possano considerare equivalenti, nonostante che l'omogeneizzazione sembri dare comunque valori mediamente più costanti.

**Tabella 5.** Percentuali di risultati negativi per *Salmonella* ottenuti dall'analisi dei fanghi sottoposti ai diversi trattamenti e provenienti dall'impianto A e dall'impianto B.

<b>TRATTAMENTI</b>	<b>% di risultati negativi</b>	
	<b>A</b>	<b>B</b>
Agitazione	76	48
Sonicazione	40	32
Omogeneizz.	28	16
Triturazione	66	32

**Tabella 6.** Percentuali di risultati negativi per *Salmonella* registrate nei campioni di fango degli impianti A e B. I valori sono suddivisi in base ai diversi trattamenti e combinazioni di terreni di coltura.

TRATTAMENTO	COMBINAZIONE DI TERRENI			
	S-H	S-Rm	Rp-H	Rp-Rm
<b>% di risultati negativi</b>				
<b>A</b>				
Agitazione	71	78	93	100
Sonicazione	21	43	43	71
Omogeneizz.	0	36	36	50
Triturazione	67	71	71	57
<b>B</b>				
Agitazione	44	50	44	50
Sonicazione	12	37	31	44
Omogeneizz.	0	25	19	19
Triturazione	31	12	44	37

**S-H** = Selenite Cystine broth-Hektoen Enteric Agar.

**S-Rm** = Selenite Cystine broth-Rambach Agar.

**Rp-H** = Rappaport Vassiliadis R10 broth-Hektoen Enteric Agar

**Rp-Rm** = Rappaport Vassiliadis R10 broth-Rambach Agar.

**Tabella 7.** Valori percentuali calcolati in base ai risultati positivi ottenuti per *Salmonella* sui terreni di isolamento dopo incubazione a 24 e 48 h dei brodi di arricchimento. Le percentuali vengono riportate suddivise in funzione dei diversi trattamenti subiti dai campioni di fango degli impianti A e B.

TRATTAMENTO	% di risultati positivi			
	A		B	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Agitazione	18	11	53	53
Sonicazione	61	50	75	63
Omogeneizz.	86	61	84	84
Triturazione	25	25	66	72

Anche in relazione ai substrati colturali sembrano evidenziarsi alcune differenze (tabella 6). Dai risultati ottenuti, la combinazione Selenite Cystine broth - Hektoen Enteric Agar sembra dimostrare una migliore capacità di

rilevamento del microrganismo ricercato. Ciò è evidenziabile dal numero maggiore di prove che hanno dato esito positivo.

Il terreno di isolamento Rambach Agar, sperimentato nel nostro laboratorio per la prima volta per la ricerca di *Salmonella* in campioni di fango, nonostante l'alta selettività dimostrata nel ridurre la presenza della flora batterica concorrente sembra, rispetto all'Hektoen Enteric Agar, inibire in alcuni casi anche la crescita del patogeno. Ciò si è verificato soprattutto quando l'isolamento è stato effettuato dal brodo di arricchimento Rappaport Vassiliadis R 10. Infatti con questa combinazione sono stati ottenuti il maggior numero di risultati negativi.

Alcune prove sono state anche effettuate utilizzando come terreno di arricchimento il brodo al Tetrionato (Difco). I risultati ottenuti (dati non pubblicati) hanno messo in evidenza la possibilità di utilizzare, per campioni di questa tipologia, questo substrato in sostituzione del Brodo alla Selenite.

Per quanto riguarda gli isolamenti effettuati ai diversi tempi di incubazione dei brodi di arricchimento (tabella 7), non sembrano evidenziarsi differenze di rilievo, sebbene, in alcuni casi, sembra che tempi superiori alle 24 ore possano ridurre la possibilità di rilevare *Salmonella*.

I saggi di differenziazione per *Salmonella*, svolti successivamente all'isolamento, hanno permesso di selezionare le colonie del patogeno e di escludere ceppi di *Proteus* e *Citrobacter* che possono essere confusi con *Salmonella* se le colonie sono sottoposte alla sola prova della fermentazione degli zuccheri su Kligler Iron Agar. In questo modo sono stati eliminati circa il 15% dei falsi positivi cresciuti su Hektoen Enteric Agar e il 9% di quelli cresciuti su Rambach Agar.

Alcune delle colonie identificate come *Salmonella* sono state tipizzate. Da entrambi i tipi di fango sono stati prevalentemente isolati stipiti di *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* in percentuale superiore al 10% (tabella 8). È interessante notare l'isolamento, nei fanghi dell'impianto B, di *Salmonella banana*, stipite di probabile origine africana, la cui presenza nel centro Italia sembra non fosse stata ancora riscontrata.

La ricerca dei coliformi fecali nei campioni di fango dei due impianti di trattamento sembrerebbe confermare, anche in questo caso, che la tecnica di omogeneizzazione per il trattamento del fango possa essere più efficace per il rilevamento dei microrganismi ricercati in questo studio. Infatti i risultati ottenuti con i diversi trattamenti

**Tabella 8.** Sierotipi di *Salmonella* isolati dai fanghi provenienti dai due impianti di trattamento: A e B.

SIEROTIPO	A		B	
	frequenza	%sul totale degli isolati	frequenza	%sul totale degli isolati
<i>S. agona</i>	2	4,0	3	3,8
<i>S. anatum</i>	2	4,0	3	3,8
<i>S. banana</i>	-	-	2	2,5
<i>S. brandenburg</i>	1	2,0	2	2,5
<i>S. bredeney</i>	1	2,0	2	2,5
<i>S. derby</i>	3	6,0	5	6,3
<i>S. enteritidis</i>	8	16,0	14	17,6
<i>S. give</i>	1	2,0	1	1,2
<i>S. goldcoast</i>	1	2,0	1	1,2
<i>S. heidelberg</i>	1	2,0	2	2,5
<i>S. infantis</i>	3	6,0	5	6,3
<i>S. isangi</i>	-	-	1	1,2
<i>S. kentucky</i>	1	2,0	1	1,2
<i>S. kottbus</i>	1	2,0	1	1,2
<i>S. livingstone</i>	1	2,0	2	2,5
<i>S. london</i>	1	2,0	2	2,5
<i>S. manhattan</i>	1	2,0	1	1,2
<i>S. montevideo</i>	1	2,0	2	2,5
<i>S. newlands</i>	1	2,0	-	-
<i>S. newport</i>	-	-	2	2,5
<i>S. panama</i>	3	6,0	2	2,5
<i>S. senftenberg</i>	1	2,0	1	1,2
<i>S. shannon</i>	1	2,0	1	1,2
<i>S. typhimurium</i>	7	14,0	11	13,8
<i>S. virchow</i>	1	2,0	1	1,2
non tipizzabili	7	14,0	12	15,1
<b>totale</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>



**Tabella 9.** Concentrazioni di coliformi fecali in fanghi disidratati. Impianto di trattamento A. I valori sono espressi per grammo di sostanza secca (/g ss) .

CAMPIONI	Coliformi fecali (g/ss)		
	TRATTAMENTI		
	Agitazione	Sonicazione	Omogeneizz.
1°	$3 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
2°	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
3°	$5 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$
4°	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$
5°	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
6°	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$
7°	$3 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$

**Tabella 10.** Concentrazioni di coliformi fecali in fanghi disidratati. Impianto di trattamento B. I valori sono espressi per grammo di sostanza secca (/g ss) .

CAMPIONI	Coliformi fecali (g/ss)			
	TRATTAMENTI			
	Agitazione	Sonicazione	Omogeneizz.	Triturazione
1°	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^3$
2°	$7 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
3°	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$
4°	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$
5°	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
6°	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
7°	$8 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
8°	$7 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$

(tabelle 9 e 10) hanno evidenziato mediamente differenze di 1 ordine di grandezza, per entrambi i tipi di fango, se si considera la tecnica di agitazione meccanica rispetto a quella di omogeneizzazione. Infatti il valore medio dei coliformi fecali calcolato come UFC/g ss nei fanghi dell'impianto A e rilevato operando sul fango con la semplice agitazione risulta essere pari a  $3 \cdot 10^4$  UFC/g ss, rispetto a un valore medio annuo pari a  $1 \cdot 10^5$  UFC/g ss ottenuto dagli stessi fanghi dopo omogeneizzazione. Similmente sono stati calcolati valori medi annui di  $3 \cdot 10^4$  UFC/g ss e  $1 \cdot 10^5$  UFC/g ss rispettivamente per i fanghi trattati con l'agitazione meccanica e l'omogeneizzazione, provenienti dall'impianto B.

## 6. Conclusioni

La maggior parte dei microrganismi presenti nei fanghi di depurazione sono reciprocamente aggregati a costituire la componente particellare del fango. Pertanto la caratterizzazione microbiologica di questa matrice può risultare non scevra di difficoltà e la sua analisi può portare a valutazioni non corrette riguardo alla qualità igienica dei campioni esaminati.

Gli esperimenti svolti in questa indagine hanno messo in evidenza, per quanto riguarda l'analisi dei fanghi, la possibilità di ottenere risultati diversi se, all'analisi microbiologica vera e propria, si fa precedere un trattamento diversamente energico. La variabilità dei valori rilevati con l'analisi microbiologica è in accordo con i dati riscontrati in letteratura [18, 20, 55]. Nonostante ciò l'omogeneizzazione meccanica sembra essere, in base ai risultati ottenuti, il trattamento più efficace sia per la maggiore costanza dei dati rilevati, sia per la capacità di fornire conte più alte dei microrganismi ricercati, siano essi *Salmonella* o coliformi fecali. È da sottolineare comunque la possibilità che microrganismi diversi (cocchi, sporigeni, come anche funghi e

virus) possano subire, in misura diversa, l'effetto disgregante dei trattamenti.

La ricerca del patogeno *Salmonella* nei fanghi di depurazione riveste particolare importanza in relazione sia al rischio igienico-sanitario legato alla sua presenza in questa matrice, sia alla sua capacità di moltiplicarsi [56] e sopravvivere, in condizioni favorevoli, nell'ambiente esterno. Il suo rilevamento soprattutto nei fanghi, risulta tuttavia non privo di difficoltà, sebbene in questa ricerca la sua presenza sia stata sempre riscontrata. Ostacoli al suo isolamento possono essere correlati alla presenza di salmonelle che, sottoposte a condizioni di stress, situazione che si verifica soprattutto in campioni di questa tipologia, non sono in grado di svilupparsi su terreni colturali troppo selettivi. Questo potrebbe spiegare i maggiori esiti negativi ottenuti dalle conte sul terreno d'isolamento Rambach Agar. A questo proposito va ricordato che anche la temperatura a cui si incubano i substrati di arricchimento e di isolamento può influenzare le risposte. È stato verificato che, se da una parte, la temperatura di 42° C, utilizzata in questo studio per l'incubazione del Rappaport Vassiliadis R 10 broth, può inibire la crescita della flora batterica concorrente che può

sopravanzare *Salmonella* limitandone quindi lo sviluppo, dall'altra può anche inibire alcuni ceppi del patogeno [57].

Le concentrazioni del patogeno rilevate nei fanghi disidratati risultano piuttosto elevate. Ciò si è verificato maggiormente nei campioni di fango dell'impianto A, che utilizza per la stabilizzazione il processo della stabilizzazione anaerobia. Gran parte degli stipti isolati sono quelli più frequentemente riscontrati in Italia e le frequenze percentuali d'isolamento, soprattutto per *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, rientrano nella media nazionale.

In base ai risultati ottenuti e in considerazione della normativa italiana relativa al reimpiego dei fanghi di depurazione in agricoltura [1], si ritiene che, almeno dal punto di vista microbiologico, i fanghi analizzati nel corso di questa indagine non sono idonei per l'uso agricolo. Tuttavia la Legge dà la possibilità di effettuare un condizionamento del fango che comporta operazioni atte a modificarne le caratteristiche fisico-chimico-biologiche: periodi di stoccaggio e operazioni di miscelazione potrebbero facilitarne un miglioramento della qualità.

Al fine di ridurre il rischio igienico-sanitario nel rispetto della tutela ambientale, si ribadisce l'opportunità di evitare, o limitare ove è possibile, lo spandimento irrazionale dei

fanghi. Infatti le non facili procedure analitiche relative alle caratteristiche di qualità di questa matrice e l'ampia variabilità dei dati ottenuti nelle analisi microbiologiche, possono portare ad errate valutazioni della qualità igienica del fango.

Idonee metodologie di analisi, opportuno controllo e la valutazione di tutte le variabili ambientali che possono intervenire quando i fanghi vengono impiegati come fertilizzanti, potrebbero rendere tuttavia conciliabile con la tutela della salute umana il rischio sanitario legato al riutilizzo dei fanghi di depurazione.

## **Bibliografia**

- 01) - **Decreto Legislativo 27/01/1992 n. 99**  
 Attuazione della direttiva 86/278/CEE concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura.  
*G. U. n. 38 del 15/02/1992.*
- 02) - **Commission of the European Communities. (1986)**  
 Council directive of 12 June 1986 on the protection of the Environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture.  
 (86/278/CEE).  
*Official Journal of the European Communities. N° L 181/6 - 181/12 of 04/07/1986.*
- 03) - **Petruzzelli G. (1989)**  
 Recycling wastes in agriculture: heavy metals bioavailability.  
*Agric. Ecosystem. Environ., 27: 493-496.*
- 04) - **Legge 10/05/1976 n. 319.**  
 Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento.  
*G. U. n. 141 del 29/05/1976.*
- 05) - **Legge 5 gennaio 1994 n. 36.**  
 Disposizione in materia di risorse idriche.  
*Suppl. G.U. n. 14 del 19 gennaio 1994.*

- 06) - **Ottaviani M., L. Bonadonna, L. Mancini, E. Veschetti, M. Gasbarro, G. Lulli, A. Zanobini, M. Divizia, L. Gabrieli, D. Donia, A. Panà. (1992)**  
Aspetti chimici e biologici delle acque e dei fanghi di risulta da un impianto di depurazione.  
*Ingegn. Amb., 21: 639 - 647.*
- 07) - **Hughes D. E. and D. A. Stafford. (1986)**  
The microbiology of the activated sludge Process.  
*Critical Rev. Environ. Contr. , 16: 233 - 257.*
- 08).- **ISTAT (1990)**  
Primi risultati dell'indagine statistica sugli impianti di depurazione delle acque reflue civili urbane - anno 1987.  
*Notiziario Istat, XI (6),:1-10.*
- 09) -**Hess E. (1980).**  
L'urgence de l'hygienisation de la boue d'épuration et sa realisation dans la pratique.  
*Wasser, Energie, Luft.n. 1:2.*
- 10) - **Hess E. (1981).**  
Possibilità e limiti dell'utilizzazione agricola dei fanghi domestici.  
*Ingegn. Amb., 10: 491 - 494.*



- 11) - **Myhalyfy E. (1980).**  
Les procédés de desinfection des boues en utilisation ou en développement.  
*Wasser, Energie, Luft*, n. 1: 2.
- 12) - **Vismara R. (1981).**  
Igienizzazione dei fanghi di depurazione.  
*Ingegn. Amb.*, 10: 269 - 274.
- 13) - **Breer C. (1980)**  
L'hygienisation des boues d'épuration avec l'aide de différents procédés de traitement.  
*Wasser, Energie, Luft* n. 1: 2
- 14) - **U. S. Environmental Protection Agency. (1971)**  
Composting of municipal solid waste in the United States.  
*SW 59, USEPA, Cincinnati.*
- 15) - **Di Pinto A. C., M. Floccia, M. Sanna. (1988).**  
La depurazione degli scarichi.  
*Edizioni delle Autonomie, Roma, 220 pp..*
- 16) - **A. A. V. V. (1991).**  
Wastewater reclamation and reuse  
*Proceedings of the International Symposium on Wastewater Reclamation and Reuse. Costa Brava, Spain, 24 - 26 September 1991.*

- 17) - **Vismara R. (1978)**  
Abbattimento dei microrganismi patogeni nelle acque,  
nei liquami e negli impianti di depurazione.  
*Ingegn. Amb.*, 7: 3 - 13.
- 18) - **Yaziz M. I. and Lloyd B. J. (1979).**  
The removal of Salmonellas in conventional sewage  
treatment process.  
*J. Appl. Bacteriol.*, 46: 131 - 134.
- 19) - **Marzouk Y., S. M. Goyal and C. P. Gerba. (1980).**  
Relationship of viruses and indicator bacteria in  
water and wastewater Israel.  
*Wat. Res.*, 14: 1585 - 1590.
- 20) - **Jones P. W., L. M. Rennisons, V. H. Lewin, D. L.  
Redhead (1980).**  
The occurrence and significance to animal health of  
salmonellas in sewage and sewage sludge.  
*J. Hyg. Camb.*, 84: 47 - 62.
- 21) - **Edmonds R. L. (1976).**  
Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied  
to a forest clearcut and potential movement into  
groundwater.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 537 - 540.

- 22) - **Havelaar A. H. (1983).**  
Hygiënische aspecten van de Toepassing van  
zuiveringsseib in the landbouw.  
*Report of the Ryksinstiturt voor volksgezondheid en  
milieuhygiëne, Bilthoven, NL.*
- 23) - **Shuval H. I., B. Fattal and P. Yekutiël. (1986)**  
State of the art review: an epidemiological approach to  
the health effects of wastewater reuse.  
*Wat. Sci. Techn., 18: 146 - 162.*
- 24) - **Hornick R. B., S. E. Greisman, T. E. Woodward,  
H. L. Dupont, A. T. Dawkins and M. J. Snyder.(1970).**  
Typhoid Fever: pathogenesis and immunologic control.  
*New Engl. J. Med., 283: 686 - 691.*
- 25) - **Craun G. F. (1987).**  
Waterborne Outbreaks.  
*Wat. Poll. Contr. Fed.: 1268 - 1271.*
- 26) - **Breer C. (1985).**  
Environmental contamination with Salmonellae by the  
spred of animal waste and sewage sludge.  
*Experientia, 41: 533.*
- 27) - **Burge W. D., P. D. Millner, N. K. Enkiri, and D.  
Hussong. (1987).**  
Regrowth of Salmonellae in Composted Sewage  
Sludge.  
*EPA/600/52 - 86/106.*

- 28) - **Lucarelli M. T. (1978).**  
Compostaggio: processo basato sulla decomposizione.  
*Difesa Ambientale* 1: 4 - 7.
- 29) - **Rabinowitz S. B. (1954).**  
The survival of coliform, fecal streptococci and  
Salmonella in soil and climate of Israel.  
*Bull. Res. Counc. Israel*, 4: 205 - 209.
- 30) - **A.F.E.E. Association Française pour l'Etude de  
l'Eau. (1979).**  
Utilisation agricole des boues d'origine urbaine.  
Paris.
- 31) - **Leong. L. Y. C. (1983).**  
Removal and inactivation of viruses by treatment  
process for potable water and wastewater: a review.  
*Water Sci. Techn.*, 15: 91 - 107.
- 32) - **Kelly S. and W. W. Sanderson (1960).**  
Density of enterovirus in sewage.  
*J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, 32: 1269 - 1273.
- 33) - **Ward R. L., C. S. Ashley and R. H. Moseley. (1976).**  
Heat inactivation of poliovirus in wastewater sludge.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 339 - 346.
- 34) - **Shuval H. I. (1982).**  
Health risks associated with water recycling.  
*Wat. Sci. Techn.*, 14: 1 - 10.

- 35) - **Watson G. H. (1985).**  
Potential risks to human and animal health arising from  
land disposal of sewage sludge.  
*J. Appl. Bacteriol., Suppl.:* 95 - 103.
- 36) - **Larkin E. P., J. T. Tierney, J. Lovett, D. Van Donsel  
and D. W. Francis. (1978).**  
Land application of sewage wastes: potential for  
contamination of food stuff and agriculture soil by  
viruses, bacterial pathogens and parasites.  
*Proceeding of symposium on the state of knowledge in  
land treatment of wastewater. USA.*
- 37) - **Anon. (1984).**  
Human gastro-intestinal infection 1977 - 1983.  
*PHLS Communicable Disease Surveillance Centre.*
- 38) - **Block. J. C. (1986).**  
Risques Sanitaire Liés à l'utilisation de boues en  
agriculture: aspects microbiologiques.  
*Sciences et techniques de l'eau* 19: 1 - 5.
- 39) - **Wallis P. M., D. L. Lehmann. (1983).**  
Biological Health risks of sludge disposal to land in  
cold climates.  
*Report of the University of Calgary, n° 388.*
- 40) - **Kowal N. E. (1985).**  
Health effects of land application of municipal sludge.  
*EPA/600/1 - 85/015.*

- 41) - **de Carneri I., G. Rodi. (1986)**  
La ricerca routinaria delle elmintiasi intestinali  
umane in Italia va continuata ed affinata.  
*Annali ISS, 22: 261 - 264.*
- 42) - **de Carneri I. (1992).**  
Parassitologia generale ed umana.  
Ed. Ambrosiana Milano, 418 pp.
- 43) - **Croppo G.P., Gomez Morales M.A. Pozio E., Virga A.,  
Pampiglione S. (1992).**  
Primi risultati siero-epidemiologici sulla cisticercosi  
umana in Italia.  
*Parassitologia, 34 suppl. 1: 162 - 163.*
- 44) - **Macpherson R., Mithchell G.B.B., Mc Cance C.B.  
(1978).**  
Bovine cysticercosis storm following the application of  
human slurry.  
*Vet. Rec., 102: 156 - 157.*
- 45) - **Foster D. H. and R.S. Engelbrecht. (1973).**  
Microbial hazards in disposing of wastewater on soil.  
In: W. E. Sopper and L. T. Kardos ed. S., Pennsylvania  
*Recycling treated municipal wastewater and sludge  
through forest and cropland.*  
State University Press, Pennsylvania.
- 46) - **Healey M. G. (1984).**  
Guidelines for the utilization of sewage sludge on land in  
United Kingdom.

*Wat. Sci. Techn.*, 19: 461 - 471.

- 47) - **Little M. D.** (1980).  
 Agents of health significance: Parassites. In :G. Bitton,  
 B. L. Damron, G. T. Edds, and J. M. Davidson eds.  
*Sludge. Health Risks of land Application.*  
 Ann. Arbor Science Publishers, Michigan.
- 48) - **Forster C. F.** (1971).  
 Floc formation in activated sludge.  
*Water Res.*, 5: 861 - 863.
- 49) - **Farrah S. R. and G. Bitton.** (1984).  
 Enteric bacteria in aerobically digested sludge.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 831 - 834.
- 50) - **IRSA CNR.** (1983)  
 Metodi analitici per i fanghi. Parametri biochimici e  
 biologici.  
*Quaderni IRSA CNR n° 64.* Consiglio Nazionale delle  
 Ricerche, Roma.
- 51) - **Bae Yoon W. and R. A. Rosson.** (1990).  
 Improved method of enumeration of attached bacteria  
 for study of fluctuation in the abundance of attached  
 and free-living bacteria in response to diel variation in  
 seawater turbidity.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 595 - 600.

*Direttore reggente dell'Istituto Superiore di Sanità  
e Responsabile scientifico Giuseppe Vicari*

*Direttore responsabile: Vilma Alberani*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali  
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988*

*Roma, settembre 1994 (n. 3) 6° Suppl.*