

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Clostridium perfringens
come indicatore di contaminazione ambientale
e suo significato sanitario

Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco,
Anna Maria D'Angelo, Rosella Marini

Laboratorio di Igiene Ambientale

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

02/8

Istituto Superiore di Sanità

***Clostridium perfringens* come indicatore di contaminazione ambientale e suo significato sanitario.**

Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Anna Maria D'Angelo, Rosella Marini

2002, 39 p. Rapporti ISTISAN 02/8

Vengono riportati i risultati di una ricerca effettuata nell'ambito di indagini svolte per la verifica della significatività degli indicatori nel campo della microbiologia ambientale. Particolare attenzione è stata rivolta alla specie *Clostridium perfringens* quale parametro in grado di sopravvivere più a lungo nell'ambiente e quindi utile indicatore dell'efficienza di trattamento (termico del compost e di disinfezione di acque reflue) di alcune matrici ambientali ponendo anche l'accento sulle correlazioni con altri gruppi di microrganismi. I risultati ottenuti hanno evidenziato la potenzialità della specie e la sua significatività come indicatore di qualità.

Parole chiave: Acqua, Ambiente, Compost, *Clostridium perfringens*, Indicatori microbici, Inquinamento, Metodi analitici

Istituto Superiore di Sanità

***Clostridium perfringens* as an environmental pollution indicator and its hygienic role.**

Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Anna Maria D'Angelo, Rosella Marini

2002, 39 p. Rapporti ISTISAN 02/8 (in Italian)

Results obtained during an investigation on different environmental matrices are reported. The study focused on the potential validity of *Clostridium perfringens* as efficient indicator of treatment for products of composting and wastewater. Significant results were observed in relation to both some correlations with other microorganisms and its capability to persist longer during hygienic treatments.

Key words: Analytical methods, Compost, *Clostridium perfringens*, Environment, Pollution indicators, Water pollution

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

INDICE

Introduzione	1
1. Il genere <i>Clostridium</i>	4
2. Compost come matrice ambientale: un potenziale rischio sanitario	6
3. Acqua: risorse e sprechi	9
4. Metodologie analitiche	11
4.1. Campioni analizzati	11
4.1.1. Metodologia per la ricerca di <i>Clostridium perfringens</i> in campioni di compost e di acque reflue	11
5. Risultati delle analisi microbiologiche dei campioni di compost e delle acque reflue	14
5.1. Valori di concentrazione riscontrati per <i>Clostridium perfringens</i>	14
5.2. Presenza di altri parametri microbiologici e verifica delle correlazioni	17
6. Valutazione dei dati ottenuti	18
Conclusioni	20
Bibliografia	21
Appendice A Dati relativi alla presenza di <i>Clostridium perfringens</i> nei campioni di compost	23
Appendice B Dati relativi alla presenza di <i>Clostridium perfringens</i> nei campioni di acque reflue	29
Appendice C Dati relativi alla presenza di altri parametri microbiologici nel compost e nelle acque reflue	35

INTRODUZIONE

Uno dei problemi più importanti e attuali della sanità pubblica riguarda i rapporti esistenti fra le condizioni ambientali e la salute umana. Nella valutazione di tutti i fattori che possono concorrere alla definizione di questi rapporti ci si trova spesso davanti a difficoltà legate a una scarsa conoscenza sia delle caratteristiche degli inquinanti, sia della loro capacità di diffusione e mantenimento nell'ambiente. Ciò ha finora impedito l'esatta conoscenza del ruolo esercitato dall'ambiente nella genesi di molte patologie.

Da tutto ciò emerge, pertanto, come la salvaguardia dell'ambiente rappresenti oggi una delle più proficue misure di prevenzione (1) e, come tale, meriti un interesse prioritario; infatti anche se l'uomo è forse, fra i diversi organismi viventi, quello dotato di maggiori capacità di adattamento non può avere una capacità illimitata, anche perché attualmente si trova nella condizione di subire stimoli ambientali a rapida insorgenza e rilevanti sia per entità che per durata.

Primo passo verso una razionale gestione ambientale è la conoscenza delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche delle diverse matrici ambientali (aria, acqua, suolo).

L'acquisizione di dati analitici per la determinazione della qualità ambientale diventa quindi prioritaria in funzione di qualsiasi intervento di risanamento ambientale, di prevenzione e tutela della salute pubblica.

Le indagini di controllo sulla qualità ambientale, ai fini della tutela della salute, vengono effettuate sulla base di normative specifiche nazionali o di recepimento di direttive europee. Le normative definiscono valori limite e parametri per le diverse matrici ambientali, stabiliti in funzione della diversa destinazione d'uso dello specifico ambiente.

Per quanto riguarda i controlli di tipo più strettamente sanitario, le normative, generalmente, richiedono la determinazione di microrganismi indicatori di contaminazione, sebbene la determinazione microbiologica della qualità di un dato ambiente, in teoria, dovrebbe basarsi sulla ricerca di microrganismi patogeni. Tuttavia da un punto di vista pratico, non è possibile procedere alla loro ricerca per diversi motivi: 1) troppi sarebbero i microrganismi patogeni da ricercare (andrebbero cercati tutti i patogeni che costituiscono un rischio per l'uomo, legati alle diverse vie di esposizione: ingestione, inalazione, contatto); 2) l'assenza dimostrata di un patogeno non dà la certezza dell'assenza di altri patogeni; 3) non esistono metodiche atte al rilevamento di tutti i potenziali patogeni e anche quelle indirizzate ai microrganismi enterici, i più comunemente ricercati, sono indaginose e poco sensibili.

Si deve inoltre considerare che in genere i microrganismi patogeni, tranne alcuni casi, hanno uno scarsissimo grado di adattabilità all'ambiente esterno. Si può quindi verificare il caso di esiti negativi nella loro ricerca, anche in casi di inquinamento recente o in atto. Inoltre, i dati desunti dalla ricerca dei patogeni, le cui concentrazioni nell'ambiente non sono predittive e sono legate a fattori diversi, primo fra tutti la diffusione delle patologie nella popolazione, condurrebbero a conclusioni poco attendibili.

Pertanto nelle analisi di routine, soprattutto per la determinazione della qualità della matrice acqua, si ricorre ad un artificio che si assume possieda requisiti di affidabilità ed efficacia. Si considera che il rischio di contrarre malattie causate da agenti eziologici specifici (batteri, virus, parassiti) sia in relazione al suo grado di fecalizzazione, e quindi alla diffusione di organismi, patogeni e non patogeni, che, vivendo nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, entrano a far parte del ciclo a trasmissione fecale-orale.

Tra i microrganismi presenti nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, come costituenti della normale flora microbica, si ritrovano in concentrazioni elevate

Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali e spore di Clostridi solfitoreduttori. Questi gruppi di batteri presentano il vantaggio, rispetto ai patogeni di cui dovrebbero essere indicatori, di essere costantemente presenti in ambienti contaminati, di essere in concentrazioni rilevabili e di essere in grado di mantenersi più a lungo nell'ambiente esterno.

La loro ricerca pertanto è utilizzata per segnalare la eventuale presenza di patogeni nell'ambito dei controlli di qualità routinari delle diverse matrici ambientali.

Il concetto di indicatore risale al secolo scorso. Nel 1854 fu John Snow che, nel corso di uno studio epidemiologico sul problema dell'origine e della modalità di diffusione di un'epidemia di colera che si era sviluppata a Londra, affrontò il problema formulando l'ipotesi del ruolo dell'acqua come veicolo di trasmissione dell'infezione, in un periodo in cui venivano effettuate soltanto analisi chimiche per la valutazione della potabilità. In seguito poi agli studi di Pasteur e di altri ricercatori, divenne sempre più chiaro il ruolo di alcuni microrganismi come causa di malattia. Si sentì quindi l'esigenza, per i motivi accennati precedentemente, di selezionare, nell'ambito dei microrganismi, gruppi di batteri che potessero funzionare da indicatori di contaminazione fecale.

L'indicatore deve avere determinate caratteristiche affinché il suo rilevamento acquisti significatività, in relazione al rischio reale costituito dalla presenza dei patogeni. I criteri di scelta di un microrganismo, o di un gruppo di microrganismi, da utilizzare come indicatori, sono i seguenti: 1) indicatore e patogeno dovrebbero essere assenti o presenti contemporaneamente; 2) indicatore e patogeno dovrebbero essere in rapporti numerici costanti (l'indicatore dovrebbe, preferibilmente, essere numericamente in eccesso rispetto al patogeno); 3) la resistenza del patogeno e quella dell'indicatore alle condizioni ambientali, naturali o artificiali, come ad esempio alla disinfezione, dovrebbe seguire la stessa cinetica; 4) l'indicatore dovrebbe essere caratterizzato dall'incapacità di replicazione nell'ambiente; 5) i metodi di rilevamento e di enumerazione degli indicatori dovrebbero essere semplici e rapidi e i risultati ottenuti attendibili.

Come già anticipato, gli indicatori microbiologici di contaminazione fecale, tradizionalmente selezionati perché più rispondenti di altri microrganismi a questi criteri, sono i Coliformi totali, i Coliformi fecali e gli Streptococchi. Accanto ad essi, in alcune normative sono inclusi *Escherichia coli*, Clostridi solfitoreduttori, *Clostridium perfringens* e *Pseudomonas aeruginosa*.

In particolare i Clostridi solfitoreduttori e *Clostridium perfringens*, grazie alla loro capacità di formare spore, quindi forme ad alta resistenza al calore e alla disinfezione, e a condizioni ambientali avverse, sono in grado di sopravvivere nell'ambiente per lunghi periodi di tempo. La loro presenza va quindi interpretata come il segnale di un inquinamento pregresso, e possono quindi essere considerati parametri importanti da determinare anche nella valutazione dell'efficacia di sistemi di trattamento e disinfezione.

Clostridium perfringens, in particolare, è stato recentemente inserito, come nuovo parametro, nella direttiva europea (Direttiva del Consiglio dell'Unione Europea 98/83/CE del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano pubblicata sulla *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* n. L330 il 5 dicembre 1998) per il controllo della qualità delle acque destinate al consumo umano. Esso, infatti, quale microrganismo in grado di formare spore, è capace di adattarsi ad ogni tipo di condizione ambientale, anche la più ostile, e questo può farlo considerare un buon indicatore di contaminazione e di qualità delle acque che hanno subito un trattamento.

Non si riscontra, in alcuni casi, una correlazione tra la sua densità e quella dei più tradizionali indicatori quali i coliformi fecali (2).

L'introduzione recente di *Clostridium perfringens* tra gli indicatori ha fatto sì che, a tutt'oggi, non sia stato definito un metodo pratico, affidabile e facilmente ripetibile per la sua

ricerca in campioni ambientali. Anche in quest'ottica si inserisce lo studio di cui vengono riportati i risultati.

Nel lavoro di seguito riportato, si è proceduto alla ricerca di *Clostridium perfringens* in diverse matrici ambientali al fine di verificare la sua diffusione nell'ambiente idrico considerando acque reflue grezze e trattate di un impianto di trattamento di acque di scarico (Impianto di depurazione di Roma Nord); in questo caso, per lo stesso parametro, è stata anche verificata l'efficienza di trattamento dell'impianto durante le varie fasi di depurazione dei reflui. I prelievi e le analisi sono stati eseguiti mensilmente nel periodo gennaio-dicembre 2000.

Nello stesso periodo sono stati analizzati campioni da impianti di compostaggio per seguire l'andamento e l'eventuale abbattimento delle concentrazioni del microrganismo durante le fasi operative di produzione del compost. Gli impianti considerati, distribuiti sul territorio nazionale, sono stati selezionati tra quelli significativi per caratteristiche distintive delle diverse realtà produttive.

Inoltre sono stati valutati, per la loro produttività e selettività, due terreni colturali selettivi utilizzando una metodica analitica scelta sulla base di risultati analitici precedentemente acquisiti nel laboratorio dove è stata svolta la ricerca.

Inoltre, poiché è stata effettuata anche la determinazione di altri parametri microbiologici quali Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, sono state calcolate le eventuali correlazioni tra questi gruppi di microrganismi e *Clostridium perfringens*, per verificare la possibilità di individuare un'associazione tra i diversi parametri microbiologici.

1. IL GENERE CLOSTRIDIUM

Il genere *Clostridium* fu identificato da Prazmowski nel 1880 (3). Si tratta di bacilli Gram-positivi (talora debolmente Gram-positivi o anche Gram-negativi), in gran parte mobili per flagelli peritrichi e raramente capsulati. Producono spore generalmente a localizzazione terminale o subterminale. La maggior parte dei clostridi sono normalmente saprofiti e si ritrovano negli strati del suolo poveri di ossigeno (4) e nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo (5-7).

Il genere *Clostridium* è molto eterogeneo riguardo all'ossigeno; si ritrovano, infatti, vicino a specie moderatamente aerotolleranti (*C. aerotolerans*, *C. histolyticum*, ecc.), specie di anaerobi obbligati (*C. perfringens*, *C. haemolyticum*, ecc.) che mancano del sistema dei citocromi e di catalasi, e producono ATP esclusivamente mediante reazioni di fosforilazione a livello del substrato.

La temperatura è un parametro discriminante per i clostridi: alcuni ceppi di *Clostridium perfringens* sono molto sensibili all'azione del calore, mentre altri lo sono meno (8).

La temperatura sembra avere un'influenza sull'idrolisi dell'amido e sulla crescita (9). Anche l'attività della lecitinasi, enzima che si usa come prova biochimica per la differenziazione di *Clostridium perfringens* da altre specie dello stesso genere, sembra essere legata alla temperatura (10).

In relazione alla capacità di resistenza alle temperature, sono state svolte da Yamagishi e collaboratori (11) indagini su ceppi tossigeni e non tossigeni di *Clostridium perfringens*. È stato evidenziato che i ceppi tossigeni presentavano una minore capacità di resistenza rispetto a quelli non tossigeni che mostravano, alla temperatura di 100 °C, una resistenza maggiore e variabile tra il 20 e il 100%.

I clostridi producono una grandissima varietà di enzimi che possono ritrovarsi nell'ambiente, alcuni dei quali dotati di alta tossicità per gli organismi animali e quindi da considerare come delle vere e proprie esotossine.

Proprio all'azione di due di queste esotossine, le potentissime tossina tetanica e tossina botulinica, dobbiamo patologie umane di notevole interesse che vedono come protagonisti *Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*, che provocano rispettivamente il tetano e il botulismo. In entrambe le infezioni l'effetto delle tossine si esplica attraverso l'inibizione della trasmissione degli impulsi nervosi nei nervi motori provocando, nel soggetto colpito, la morte per paralisi (12).

Le affezioni umane sono la conseguenza di un'introduzione accidentale nei tessuti delle forme vegetative o delle spore, come nel caso del tetano e della gangrena, oppure dell'assunzione delle tossine con alimenti contaminati, come nel caso del botulismo e di altre tossinfezioni alimentari (3).

La gangrena gassosa consiste nell'infezione, operata da alcuni clostridi tra cui *Clostridium perfringens*, di una preesistente lesione traumatica. I suddetti batteri, attraverso le loro esotossine, provocano una più o meno estesa necrosi tissutale con conseguenti condizioni generali più o meno gravi.

Riguardo alle tossinfezioni alimentari, generalmente la dose infettante in grado di produrre un'infezione da *Clostridium perfringens* è di 10^6 o più microrganismi ingeriti. L'enterotossina viene liberata nell'intestino durante la sporulazione, cioè la trasformazione da cellula vegetativa in spora, cioè struttura incapace di riprodursi ma resistente al calore. Clinicamente queste tossinfezioni sono caratterizzate da dolori addominali acuti e diarrea.

In questa ricerca viene dedicata particolare attenzione alla specie *Clostridium perfringens*, agente eziologico della gangrena gassosa e di gravi tossinfezioni alimentari, ma qui considerato dal punto di vista ambientale, in quanto è risultato essere particolarmente adatto come indicatore biologico (2, 13, 14).

Clostridium perfringens è anaerobio, la verifica dell'assenza dell'enzima catalasi è una delle prove biochimiche che vengono effettuate per distinguere questo microrganismo dalle diverse specie appartenenti al genere *Bacillus* (15). Per la necessità di strette condizioni anaerobiche, generalmente, nelle matrici ambientali, le cellule di *Clostridium perfringens* non si ritrovano negli strati superficiali saturi d'aria, dove è invece possibile ritrovare le spore; anche queste ultime, però, richiedono condizioni anaerobiche per la loro germinazione, che quindi potrà avvenire solo nel momento in cui si verificheranno le condizioni favorevoli allo sviluppo della forma vegetativa: assenza di ossigeno e presenza degli opportuni nutrienti.

Clostridium perfringens è stato proposto, tra i clostridi solfitoriduttori, come indicatore di inquinamento fecale, in quanto specie di sicura origine fecale (16).

Il più importante requisito degli indicatori fecali è, naturalmente, quello di avere una alta presenza quantitativa nelle feci umane; per ciò che riguarda *Clostridium perfringens* le sue concentrazioni nelle feci umane sono comprese tra 10^2 - 10^7 UFC/g, rispetto alle quantità dei coliformi fecali che variano da 10^7 a 10^9 UFC/g.

La specie è ampiamente distribuita sia negli ambienti acquatici che in quelli terrestri sotto forma di spore: negli affluenti degli impianti di depurazione raggiunge concentrazioni di 10^5 /100 ml (2); nel suolo le concentrazioni possono essere di 10^3 UFC/g di sostanza secca (4). Le spore del microrganismo sono ampiamente resistenti nell'ambiente e non si riproducono nei sedimenti acquatici (caratteristica diversa dai coliformi termotolleranti) (17).

È interessante notare che le feci canine possono presentare concentrazioni intorno a 10^9 UFC/g di sostanza secca, mentre le specie suine presentano concentrazioni del microrganismo più simili a quelle delle feci umane. *Clostridium perfringens* è generalmente meno comune o è assente nelle feci degli altri animali a sangue caldo. Pertanto, sebbene i cani abbiano concentrazioni di coliformi e streptococchi simili a quelle rilevabili nell'uomo, il rapporto relativamente più alto di spore di *Clostridium perfringens* trovato nelle feci dei cani potrebbe essere un utile indicatore per distinguere il tipo di contaminazione animale o umana (18).

Indagini svolte su sedimenti marini lungo le coste del Mare Adriatico (19) hanno messo in evidenza concentrazioni medie di *Clostridium perfringens* dell'ordine di 10^3 UFC/100 g di sedimento. I risultati ottenuti concordavano con quelli rilevati in sedimenti estuari da altri autori (20).

Analisi svolte in sedimenti lungo il corso di alcuni fiumi laziali (21) hanno evidenziato l'importanza della ricerca di *Clostridium* al fine di ottenere un quadro più accurato degli effetti prodotti da apporti inquinanti anche su scala temporale, diversamente dai classici indicatori batterici che forniscono indicazioni più puntuali e contingenti.

Comunque molta cautela deve essere posta nel valutare le sue densità nell'ambiente. Infatti è stato suggerito che le spore di *Clostridium perfringens* non siano adatte ad indicare una contaminazione diversa da quella di effluenti fognari e che quindi il loro eventuale rilevamento sembra più utile a segnalare la contaminazione dovuta a scarichi contenenti protozoi e virus (13).

Attualmente la ricerca di *Clostridium perfringens* può essere considerata un valido supplemento per la valutazione della qualità di matrici ambientali, soprattutto se con caratteristiche particolari, quali: acque clorate (22-24); acque non trattate che contengono scarichi industriali letali per i microrganismi non sporigeni (14); acque reflue; compost; tutti casi in cui la matrice ambientale ha subito particolari trattamenti e/o comunque sarebbe difficile riscontrare, per ridotta capacità di sopravvivenza in quelle condizioni, microrganismi indicatori che si presentano in forma vegetativa (25).

2. COMPOST COME MATRICE AMBIENTALE: UN POTENZIALE RISCHIO SANITARIO

Diversi tipi di rifiuti possono diventare ottimi ammendanti e fertilizzanti per terreni agricoli. L'uso di rifiuti "compostati" in agricoltura è un antico metodo di riutilizzo degli scarti organici. Il compostaggio è un processo biologico di trattamento, consistente nella decomposizione aerobica della frazione organica presente nei rifiuti solidi e nei fanghi biologici, con formazione di un prodotto simile all'humus, detto "compost", che può essere utilizzato in agricoltura come ammendante e fertilizzante, per le sue caratteristiche di elevato contenuto in nutrienti. Durante il processo del compostaggio, si verifica, come in tutti i processi di maturazione, un abbattimento di tutti i microrganismi patogeni, con conseguente stabilizzazione della sostanza organica e riduzione dei cattivi odori.

Secondo una recente indagine sulla composizione dei rifiuti solidi urbani in Italia (26), è risultato che dei 25 milioni di tonnellate prodotte annualmente, circa il 30% è costituito proprio da frazione organica così divisa :

- 8,5 milioni di tonnellate di sostanza organica dovuta a scarti vegetali, resti di cibo, carta e cartone;
- 3,5 milioni di tonnellate provenienti da fanghi di depuratori civili;
- 2 milioni di tonnellate derivanti dalle produzioni agroindustriali.

Questi dati evidenziano quanto sia il potenziale quantitativo di rifiuti da riconvertire ad uso agricolo, che potrebbe risolvere il problema, da una parte, del loro smaltimento, dall'altro di un minor utilizzo di sostanze chimiche di sintesi in agricoltura.

Un impianto di compostaggio tipo è generalmente costituito da: una fossa orizzontale con copertura a serra, profonda in genere 3 metri, lunga 60 metri, e alta 1 metro, che può trattare circa 1000 tonnellate di residui all'anno; una macchina rivoltatrice che si muove su rotaie; un sistema di areazione.

Il processo biologico del compostaggio è generalmente diviso in due fasi:

1. *Fase termofila o fase attiva*

Durante questa fase la flora batterica, presente nel cumulo di rifiuti raccolti nella fossa, opera la degradazione dei composti organici semplici, quali carboidrati, acidi organici, aminoacidi, ecc., attraverso reazioni che comportano un notevole consumo di ossigeno e conseguente produzione di CO₂ e di energia sotto forma di calore. Il calore prodotto da queste reazioni esotermiche, provoca un innalzamento della temperatura (fase esotermica) della massa organica fino al raggiungimento di valori massimi di 60-70 °C. È proprio questo innalzamento della temperatura che opera una selezione microbica a svantaggio di molti batteri, soprattutto patogeni, che hanno una minore adattabilità a condizioni ambientali stressanti. Ne escono invece avvantaggiati funghi e attinomiceti che, nella seconda fase di maturazione o umidificazione, opereranno la degradazione delle sostanze organiche complesse. La durata di questa prima fase è variabile in dipendenza del tipo di residui trattati e della tipologia dell'impianto.

2. *Fase di maturazione o di umidificazione*

Durante questa seconda fase avviene una più lenta decomposizione del prodotto; si assiste alla demolizione delle molecole organiche più complesse e resistenti (lignina, cellulosa, ecc.) fino all'ottenimento dei composti umici. Tale fase avviene in una zona scoperta,

dove il prodotto della prima fase viene posto in cumuli per un periodo di tempo adeguato (circa 60 giorni).

Al termine del processo, dopo circa 90 giorni, il prodotto si dovrebbe presentare completamente stabilizzato dal punto di vista microbiologico e non dovrebbe emettere più alcun odore sgradevole.

I prodotti finali del processo di compostaggio sono di tipo gassoso (vapor acqueo e anidride carbonica), e di tipo solido (sostanza organica, colloidali umici e sali minerali).

Durante tutte e due le fasi di trattamento, la temperatura viene costantemente tenuta sotto controllo.

Possiamo dire che il principio di funzionamento del compostaggio si basa su una “decomposizione controllata” della sostanza organica da parte dei microrganismi decompositori: infatti il fenomeno naturale della decomposizione viene utilizzato nell’impianto di compostaggio al fine di ottenere un prodotto (il compost) commercialmente utilizzabile, sfruttando il fatto che la sostanza organica è colonizzata da microrganismi.

Al termine del processo produttivo, il compost avrà le seguenti caratteristiche:

- si presenta come un terriccio di colore marrone scuro;
- occupa minore volume rispetto al materiale di partenza;
- ha una struttura fisica omogenea ed è facilmente stoccabile a distanza;
- dà buone garanzie di carattere igienico-sanitario, infatti le alte temperature raggiunte durante il processo rendono “igienico” il prodotto;
- è un prodotto ammendante, in quanto ricco di sostanza organica pregiata ed elementi minerali utili a migliorare la fertilità dei terreni;
- da un punto di vista biologico migliora le condizioni di assimilazione da parte delle colture, grazie all’azione delle numerose colonie batteriche in esso presenti.

Oltre ai suddetti vantaggi, se ne possono aggiungere altri di ordine strettamente ambientale:

- l’impatto ambientale di un impianto di compostaggio è certamente più contenuto rispetto ad altre attività di smaltimento dei rifiuti;
- il processo produttivo permette di ridurre la quantità di rifiuti organici da avviare allo smaltimento, nelle discariche e all’incenerimento.

Da quanto detto fino ad ora, si può comprendere l’interesse crescente per questo tipo di processo, che media diverse esigenze: diminuisce la quantità di rifiuti da smaltire; ha un impatto ambientale minore rispetto ad altre soluzioni di smaltimento; il prodotto finale può venire riciclato come ammendante e fertilizzante permettendo un minor uso di sostanze chimiche. Tutto questo fa del compost un’ottima soluzione ai problemi legati alla diffusione di prodotti chimici nell’ambiente favorendo anche la proliferazione di condizioni di eutrofizzazione nei corpi idrici superficiali e nel mare.

Impianti di compostaggio, diversi da quello standard precedentemente descritto, sono stati presi in considerazione nel presente lavoro per la raccolta dei campioni analizzati. Si trattava, in generale, di alcuni impianti estensivi e altri intensivi.

In breve, i *sistemi estensivi*, caratterizzati da una bassa capacità di fermentazione che, non provocando forti odori, permettono la disposizione “estensiva” all’aperto, si utilizzano prevalentemente nel compostaggio di scarti verdi, dovuti alla manutenzione del verde pubblico. Necessitano, essenzialmente, di piazzole o aree attrezzate per il compostaggio, e hanno un ciclo di lavorazione che possiamo dividere in tre fasi:

1. Fase di triturazione

Durante questa fase, con appositi macchinari, si miscelano i diversi materiali di partenza e al termine del procedimento, le miscele vengono poste in cumuli.

2. Fase di stabilizzazione aerobica

Durante questa fase i composti presenti nei cumuli, precedentemente formati, sono soggetti a degradazione ad opera dei microrganismi presenti.

3. Fase terminale

Alla fine di tale fase, dopo alcuni mesi, il materiale si può considerare stabile e, dopo una opportuna raffinazione, può essere stoccato sotto copertura.

Questo modello operativo presenta i seguenti vantaggi: semplicità gestionale; costo contenuto delle macchine tritiatrici; conduzione all'aperto senza problemi di cattivi odori; possibilità di poter collocare l'impianto anche su terreni non impermeabilizzati.

Diversamente i *sistemi intensivi* si applicano soprattutto ai residui alimentari provenienti da mercati, ristorazione, residui agro-industriali ad alta putrescibilità, fanghi di depurazione. Questa frazione organica, a differenza dell'altra sopra citata, ha una minore porosità, un elevato tasso di umidità, un accelerato consumo di ossigeno durante la fase attiva, e richiede, inoltre, interventi esterni principalmente di rivoltamento e adduzione di aria.

I vantaggi di questi sistemi chiusi sono miglior controllo del processo, indipendenza dalle condizioni meteorologiche, canalizzazione dell'aria proveniente dal processo di compostaggio con sistemi di abbattimento dei cattivi odori.

Negli ultimi anni l'uso del compost per le pratiche agricole ha avuto un incremento. Tuttavia, se da una parte il prodotto del compostaggio presenta il vantaggio di un basso impatto ambientale e di una riduzione della frazione organica da smaltire, dall'altra può rappresentare un rischio per la salute pubblica essendo, potenzialmente, una fonte di inquinamento. Infatti se non opportunamente controllato, sia dal punto di vista microbiologico sia chimico, può rappresentare un pericoloso mezzo di diffusione di organismi patogeni o di sostanze inquinanti. Da qui la necessità di valutare la qualità del compost, prima della sua immissione sul mercato, attraverso metodiche semplici, di costo adeguato e facilmente ripetibili.

3. ACQUA: RISORSE E SPRECHI

Il problema dell'approvvigionamento di acqua potabile sta rapidamente divenendo di estrema gravità. Gli osservatori sono concordi nel considerare che molti dei prossimi conflitti scoppieranno per il controllo delle risorse idriche. In questo preoccupante scenario non si troveranno coinvolti solo i Paesi a clima arido, come siamo portati a pensare, ma da un recente studio dell'ONU (27) si evince, che fra breve, tra gli abitanti del pianeta che saranno soggetti a problemi di approvvigionamento idrico, vi saranno cittadini polacchi e britannici.

L'uso dell'acqua per le diverse esigenze e attività comporta, in misura maggiore o minore, l'instaurarsi di condizioni di inquinamento legato alla presenza di sostanze potenzialmente dannose e tossiche e di microrganismi patogeni o potenzialmente tali. L'uomo può essere esposto al rischio sia durante la fase di utilizzazione dell'acqua, sia in quella di sua reimmissione nelle matrici ambientali sotto forma di reflui. Gli effetti di danno che l'acqua può determinare possono manifestarsi con due diverse modalità:

- per *azione diretta*: ingestione, contatto con acque inquinate, ecc.;
- per *azione indiretta*: inquinamento della catena alimentare.

In considerazione di ciò emerge il ruolo dell'acqua come possibile fattore di rischio per la salute dell'uomo, e da qui il bisogno di attuare una prevenzione al fine di garantire una buona qualità dell'acqua da utilizzare, ma anche garantire una corretta gestione delle risorse.

Di seguito vengono descritte le fasi che consentono la depurazione dei reflui civili tramite processi di trattamento naturali o artificiali che rimuovono e/o trasformano le sostanze inquinanti presenti. I sistemi di trattamento vengono realizzati con il fine di ottenere l'abbattimento dei solidi sospesi e del BOD. Questa sigla sta per Biochemical Oxygen Demand e sta ad indicare la quantità di ossigeno utilizzata dai batteri per ossidare il materiale organico biodegradabile contenuto in un liquame: quindi tanto più alto sarà questo valore, tanto maggiore sarà il contenuto di sostanze organiche.

Sia nel processo naturale che in quello artificiale, l'ossidazione delle sostanze organiche è operata da microrganismi che le demoliscono attraverso differenti processi metabolici in sostanze di struttura più semplice.

La crescita e il metabolismo microbico sono quindi fondamentali per l'efficienza dei processi di trattamento dei liquami; le trasformazioni biochimiche che si svolgono sono il risultato delle interazioni tra microrganismi appartenenti a popolazioni microbiche eterogenee.

In un generico processo di depurazione dei reflui a fanghi attivi, trattamento utilizzato nell'impianto di depurazione considerato per i prelievi dei campioni in questa ricerca, è possibile distinguere quattro fasi che si susseguono nella depurazione delle acque reflue:

– *Trattamento primario*

Ha lo scopo di eliminare il materiale sedimentabile attraverso mezzi meccanici: disgregazione e grigliatura. Attraverso la dissabbiatura vengono allontanati i particolati inerti e, con la desoleatura, si eliminano gli oli e i grassi. A questi trattamenti segue il processo di sedimentazione primaria vero e proprio, realizzato in apposite vasche, che porta alla deposizione di particelle solide e alla formazione dei fanghi attivi primari con conseguente chiarificazione del liquame. La sedimentazione ha generalmente un effetto trascurabile sull'abbattimento dei microrganismi.

– *Trattamento secondario*

È un processo biologico che permette di ossidare le sostanze organiche. Si effettua in apposite vasche attraverso insufflazione d'aria o mediante energica agitazione del

liquame, permettendo la precipitazione dei colloidi biologici e delle sostanze inorganiche sospese (28). Il carico inquinante viene considerato un substrato nutritivo che viene metabolizzato dalla massa microbica presente nella vasca di ossidazione: in questo modo si esegue la depurazione vera e propria sul modello dei processi di autodepurazione naturali. La differenza sta nel fatto che qui le condizioni sono controllate e gli spazi e i tempi sono ridotti.

– *Trattamento terziario*

Questo trattamento, o fase di sedimentazione secondaria, permette la chiarificazione del liquame proveniente dal trattamento secondario. In questo stadio si effettua la divisione tra acqua e fanghi di risulta: i fanghi sedimentano, mentre l'acqua viene separata per sfioramento. In questa fase l'abbattimento dei microrganismi patogeni, agenti eziologici di malattie a circuito oro-fecale (*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, ecc.), unitamente a quello di altri batteri responsabili di malattie per l'uomo (micobatteri, brucelle, ecc.), può raggiungere livelli molto elevati, compresi tra il 95% e il 98% (29). Contemporaneamente si osserva una diminuzione del 99% dei Coliformi fecali e degli Streptococchi fecali, indicatori classici di contaminazione fecale (30). Il trattamento in condizioni ottimali è efficace anche per l'eliminazione di un gran numero di virus, soprattutto se si opera con lunghi tempi di permanenza nella vasca di ossidazione (31). Bassi rendimenti di abbattimento si riscontrano comunque per forme più resistenti, quali protozoi, metazoi, spore di clostridi solfitoriduttori.

– *Disinfezione*

Quarta e ultima fase, la disinfezione è in relazione con le esigenze igieniche e anche con la necessità di rispondere ai requisiti di legge (32, 33). Nel caso in cui i valori dei parametri batteriologici superino i limiti consentiti dalla legge, prima della loro immissione nel corso d'acqua recettore, le acque in uscita dall'impianto di depurazione vengono sottoposte pertanto ad un trattamento di disinfezione che si esegue generalmente attraverso la clorazione e ha un'azione ossidativa sulle sostanze organiche: in questo caso si usano generalmente ipoclorito di sodio o biossido di cloro che vengono aggiunti all'acqua in uscita in opportune quantità e per tempi determinati.

La depurazione delle acque reflue negli impianti a fanghi attivi comporta la produzione di fanghi di risulta che contribuisce, come conseguenza, ad aggravare il problema dello smaltimento dei rifiuti. Una delle soluzioni a questo problema è il riutilizzo, sia diretto, dopo igienizzazione del fango, sia indiretto, tramite i processi di compostaggio estesamente descritti nel capitolo 2.

4. METODOLOGIE ANALITICHE

Nel periodo gennaio-dicembre 2000 sono state effettuate analisi su campioni provenienti da impianti di compostaggio distribuiti sul territorio nazionale e su campioni di acque di un impianto di depurazione (impianto di depurazione di Roma Nord), per la determinazione dei parametri microbiologici: Spore di *Clostridium perfringens*, Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Inoltre è stato effettuato il calcolo dei coefficienti di correlazione tra i diversi parametri microbiologici esaminati rispetto a *Clostridium perfringens* utilizzando il software statistico SPSS (versione 9.0).

Per i parametri Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Giardia* e *Cryptosporidium*, i metodi utilizzati sono quelli riportati in altri Rapporti ISTISAN (34, 35).

Per il parametro *Clostridium perfringens* le metodologie analitiche utilizzate verranno illustrate in dettaglio nei prossimi paragrafi.

4.1. Campioni analizzati

Sono stati analizzati campioni di prodotti di compostaggio e campioni di acque reflue.

Un totale di 30 campioni di compost a cadenza mensile è stato prelevato da impianti di compostaggio. A ciascun prelievo corrispondevano 3 campioni così suddivisi:

- miscela di materie prime in ingresso all'impianto (C1);
- miscela di prodotti intermedi di processo (C2);
- miscela di compost maturo di processo (C3).

Un totale di 30 campioni di acqua reflua è stato prelevato, con cadenza mensile, in diverse fasi del trattamento, presso l'impianto di depurazione di acque reflue civili preso in considerazione.

Sono stati pertanto effettuati 10 campionamenti comprendenti ciascuno:

- acqua grezza all'entrata (A1);
- acqua dopo trattamento secondario (A2);
- acqua dopo disinfezione con sodio ipoclorito (A3).

I campioni sono stati trasportati in laboratorio in contenitori refrigerati e analizzati entro le 24 ore dal prelievo.

4.1.1. Metodologia per la ricerca di *Clostridium perfringens* in campioni di compost e di acque reflue

Prima di effettuare le analisi microbiologiche, i campioni di compost sono stati risospesi in acqua fisiologica tamponata e successivamente sottoposti a trattamento di disgregazione e omogenizzazione, tramite omogenizzazione meccanica con omogenizzatore elettrico (Potter-Overhead, Weaton Instr., USA) a una potenza di 120 W per 15 secondi. Durante il trattamento la sospensione è stata mantenuta in bagno di ghiaccio.

Per la ricerca di *Clostridium perfringens* i campioni di compost in soluzione e i campioni di acque reflue sono stati sottoposti a riscaldamento con il duplice fine di eliminare le forme vegetative presenti e promuovere la germinazione delle spore (36): tutti i campioni sono stati

mantenuti alla temperatura di 75 °C per 15 minuti, a partire da acqua inizialmente fredda che, con il progressivo riscaldamento, innesca il meccanismo della germinazione delle spore (37).

Dopo raffreddamento i campioni sono stati inoculati nel terreno selettivo SPS (Sulphite Polymixin Sulphadiazine Agar, Oxoid). Il terreno è specifico per *Clostridium perfringens*, è reperibile in commercio, si trova in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.

In parallelo, i campioni sono stati inoculati nel terreno OPSP (Perfringens Agar, Oxoid), addizionato con due supplementi, SR76 (Sulphadiazina sodica, Oxoid) e SR77 (Oleandomicina fosfato, Polimixina B solfato, Oxoid); la sua preparazione si effettua secondo le istruzioni della ditta produttrice.

L'aggiunta dei due supplementi è stata effettuata sciogliendo il terreno e lasciandolo raffreddare fino ad una temperatura di circa 50 °C. I due supplementi sono stati idratati aggiungendo 2 ml di acqua distillata sterile alla polvere e dopo solubilizzazione aggiunti al terreno.

Per quanto riguarda la tecnica analitica utilizzata, è stata applicata la procedura definita come tecnica dell'inclusione nei tubi, di seguito riportata: un'adeguata e nota aliquota di campione è stata inoculata, contemporaneamente e in parallelo, nei terreni colturali agarizzati SPS e OPSP contenuti in tubi, preventivamente sciolti e mantenuti a circa 45 °C. Dopo miscelazione e solidificazione dei terreni sono stati aggiunti, sulla superficie solida, 4-5 ml di vaselina sterile per assicurare l'anaerobiosi. I tubi sono stati incubati in termostato a 37 °C per 24 - 48 ore.

Dopo lettura dei risultati sono state isolate le colonie rilevate che risultavano ben separate, per lo svolgimento delle successive prove di conferma e identificazione biochimica in relazione alla specie *Clostridium perfringens*.

Le colonie da identificare sono state isolate e stemperate in soluzione fisiologica tamponata. Successivamente, con un'ansa sterile, è stato eseguito uno striscio su terreno TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid), in piastra. Le piastre sono state poi poste in giara per anaerobiosi (38) e quindi incubate a 37 °C per 24 ore. Finito il periodo di incubazione è stata verificata la crescita delle colonie e nel caso di colonie miste sono stati eseguiti ulteriori isolamenti.

Un primo screening è stato effettuato sulle colonie isolate procedendo allo svolgimento di prove biochimiche convenzionali per discriminare e selezionare le colonie rilevate.

Le colonie da identificare sono state poste in Tioglicollato Medium (Thioglycollate Medium, Biolife), terreno liquido di trasferimento per gli anaerobi. Il terreno, in brodo, si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Prima di effettuare l'inseminazione è stato controllato il colore del terreno perché facilmente ossidabile: un viraggio dal giallo al rosso indica ossidazione. L'eventuale quantità di ossigeno in eccesso è stata quindi eliminata tramite riscaldamento del terreno stesso fino al ripristino del colore giallo. Una volta eseguita l'inseminazione, il terreno è stato posto in giara e quindi in termostato a 37 °C per 24 ore. Finito il periodo di incubazione, ogni colonia è stata inseminata sul terreno Nutrient Gelatin (Oxoid) per la verifica dell'idrolisi della gelatina e sul terreno Phenol Red Agar Base (Difco) addizionato con Glucosio all'1% per verificare la fermentazione del glucosio: *Clostridium perfringens* è positivo per entrambe le reazioni. Ai terreni, dopo inoculo della colonia da saggiare, sono stati aggiunti alcuni millilitri di olio di vaselina, per assicurare l'anaerobiosi. L'incubazione è stata effettuata a 37 °C e la lettura dei risultati svolta dopo almeno una settimana.

La lettura del risultato per la verifica dell'idrolisi della gelatina è stata effettuata ponendo la provetta inoculata in frigorifero per 45 minuti. Dopo questo periodo, il terreno, se diventato liquido, segnala una reazione è positiva per l'idrolisi della gelatina; il terreno rimasto solido indica invece una reazione negativa.

La lettura dei risultati della fermentazione del glucosio si effettua osservando il viraggio del terreno: un viraggio da rosso a giallo indica la positività.

Le colonie risultate positive a queste due prove fornivano una prima selezione per l'appartenenza alla specie *Clostridium perfringens*.

Le colonie sono state successivamente sottoposte alla prova della fermentazione del lattosio e della motilità. Il terreno Phenol Red Agar Base addizionato con Lattosio all'1% è stato utilizzato per la verifica della fermentazione del lattosio, e il Motility Test Medium (Becton Dickinson) con l'aggiunta di TTC (2,3,5 Trifeniltetrazolio cloruro, Oxoid) sterile all'1%, è stato utilizzato per saggiare la motilità delle colonie.

Clostridium perfringens è positivo al lattosio e non motile (3).

Le colonie cresciute in terreno al tioglicollato sono state inoculate nei due terreni di prova. Dopo aggiunta di olio di vaselina, gli inoculi sono stati posti in termostato a 37°C e la lettura effettuata dopo circa una settimana.

Una risposta positiva per la reazione della fermentazione del lattosio era evidenziata dal viraggio di colore dal rosso al giallo; per la prova della motilità la mancata formazione di ramificazioni nella compagine dell'agar, indice di motilità, fornisce un risultato negativo, tipico di *Clostridium perfringens*.

L'identificazione biochimica a livello di specie è stata ottenuta con le gallerie API 20A, specifiche per i microrganismi anaerobi.

In una serie di pozzetti, contenenti reagenti specifici, è stata inoculata la colonia da identificare. Dopo incubazione delle gallerie in giara a 37 °C per 24 ore, si è proceduto alla lettura del risultato che, ottenuto in base a un bionumero, basato sulla positività o negatività delle diverse reazioni, ha fornito, facendo riferimento a una banca dati di un programma software specifico, il nome della specie identificata.

5. RISULTATI DELLE ANALISI MICROBIOLOGICHE DEI CAMPIONI DI COMPOST E DELLE ACQUE REFLUE

5.1. Valori di concentrazione riscontrati per *Clostridium perfringens*

Le analisi svolte per la ricerca di *Clostridium perfringens* nei campioni di compost hanno evidenziato la costante presenza del microrganismo in tutti i 30 campioni (C1, C2, C3) esaminati.

I valori medi riscontrati nei campioni costituiti dalla miscela di materie prime (C1) sono stati calcolati pari a $5 \times 10^5 / g_{ss}$, considerando i risultati ottenuti sul terreno SPS dopo le 48 ore di incubazione. Analogamente, per le stesse condizioni, la media, calcolata per i campioni della miscela dei prodotti intermedi (C2), era pari a $2 \times 10^5 / g_{ss}$ e per il compost maturo (C3) pari a $5 \times 10^4 / g_{ss}$.

Nel compost maturo (C3), considerando i valori ottenuti con il terreno più selettivo (SPS), così individuato sulla base dei risultati delle prove di conferma e identificazione, le concentrazioni di *Clostridium perfringens* variano tra un minimo di <1 a un massimo di $2 \times 10^5 / g_{ss}$.

In questo caso, le concentrazioni medie del microrganismo sono risultate di un ordine di grandezza inferiore rispetto ai campioni di miscela di materie prime in ingresso dall'impianto (C1).

La comparazione dei risultati ottenuti prendendo in considerazione i due terreni colturali utilizzati pone in evidenza differenze tra i due substrati.

In primo luogo è stato osservato un tempo di crescita diverso delle colonie sviluppate su ciascun terreno. Nel periodo di incubazione stabilito (24-48 ore) l'SPS ha permesso la crescita di colonie, nella gran parte dei casi, tra le 24 e le 48 ore di incubazione, con risultati negativi ottenuti dopo le prime 24 ore di incubazione.

Diversamente l'OPSP ha dato risultati già dopo 24 ore con incrementi di 1-2 ordini di grandezza nelle conte rispetto all'SPS, dopo le altre 24 ore di incubazione.

I conteggi ottenuti sono risultati mediamente maggiori (1 ordine di grandezza), nel complesso, sul terreno OPSP per tutti e tre i tipi di campioni. In alcuni casi, è stato verificato che l'analisi dei campioni C2 e C3, espletata con il terreno SPS non ha prodotto colonie neanche dopo 24 ore di incubazione.

Pur tuttavia, nonostante i più elevati conteggi ottenuti sul terreno OPSP, è stata messa in evidenza una minore selettività del terreno.

Infatti nella Tabella 1, in cui sono riportati i risultati derivanti dalla identificazione delle presunte colonie di *Clostridium perfringens*, si rileva una maggiore selettività del terreno SPS, con una media di colonie confermate come *Clostridium perfringens* pari al 91%, contro il 21% di colonie confermate sull'OPSP.

Per quanto riguarda la capacità di riduzione delle concentrazioni del microrganismo durante le diverse fasi di produzione del compost (Tabella 2) sono stati osservati abbattimenti di 1-2 ordini di grandezza, con una percentuale di abbattimento finale media dell'94,6% e con un range variabile tra l'80,0% e il 99,9%, calcolati sulla base del terreno più selettivo per il rilevamento di *Clostridium perfringens*.

I risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche effettuate per la ricerca di *Clostridium perfringens* sui campioni di compost sono riportati nelle Tabelle A1-A10.

Tabella 1. Compost: percentuali di colonie identificate come *Clostridium perfringens*, isolate sui terreni colturali SPS e OPSP

Campione di compost	% di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> nei terreni di coltura	
	SPS	OPSP
1	86	33
2	100	17
3	83	20
4	100	25
5	83	14
6	100	33
7	100	14
8	86	14
9	86	25
10	88	13
Media	91	21
Minimo	83	13
Massimo	100	33

Tabella 2. Compost: percentuali di abbattimento di *Clostridium perfringens* calcolate considerando le concentrazioni nel compost maturo rispetto a quelle delle materie prime in ingresso

Campione di compost	% di abbattimento di <i>Clostridium perfringens</i> nei terreni di coltura
1	98,0
2	80,0
3	92,0
4	99,9
5	99,0
6	99,6
7	87,5
8	90,0
9	99,9
10	99,9
Media	94,6
Minimo	80,0
Massimo	99,9

Nelle Tabelle B1-B10 sono riportati i risultati delle analisi effettuate per la ricerca di *Clostridium perfringens* sui campioni di acque reflue analizzati.

Per questi campioni è stato osservato un andamento analogo in funzione del terreno di coltura utilizzato. Infatti l'OPSP ha sempre fornito conteggi più elevati (mediamente di 1 ordine di grandezza) rispetto all'SPS, sia dopo 24 che 48 ore di incubazione. D'altra parte, anche in questo caso, è stato verificato che l'identificazione delle colonie sospette confermava la maggiore selettività dell'SPS: *Clostridium perfringens* era identificato mediamente su SPS nel 94% delle colonie, mentre l'OPSP forniva una percentuale di conferma del 26% (Tabella 3).

Le concentrazioni del microrganismo ricercato nelle acque grezze all'entrata del depuratore (A1), prendendo in considerazione i risultati ottenuti sul terreno più selettivo, hanno presentato una scarsa variabilità in un range medio di 10^3 *Clostridium perfringens* /100 ml.

Tabella 3. Acque reflue: percentuali di colonie identificate come *Clostridium perfringens*, isolate sui terreni colturali SPS e OPSP

Campione di compost	% di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> nei terreni di coltura	
	SPS	OPSP
1	100	17
2	100	33
3	88	29
4	100	14
5	100	38
6	88	29
7	86	17
8	100	29
9	100	25
10	89	25
Media	94	26
Minimo	88	14
Massimo	100	38

Valori di 1 ordine di grandezza inferiore sono stati osservati nei campioni di acqua sottoposti a trattamento secondario (A2).

Nei campioni di acqua dopo disinfezione i conteggi di *Clostridium perfringens* si sono ridotti ulteriormente di circa 1 ordine di grandezza rispetto a quelli ottenuti dopo trattamento secondario, con valori variabili tra <1 e 5×10^2 /100 ml di acqua.

La percentuale media di abbattimento del microrganismo alla fine del trattamento è risultata pari al 97,9% con un minimo del 93,0% e un massimo del 99,9% (Tabella 4).

Tabella 4. Acque reflue: Percentuali di abbattimento di *Clostridium perfringens* calcolate considerando le concentrazioni nella fase finale, dopo disinfezione, rispetto a quelle della fase iniziale, all'ingresso dell'impianto di depurazione

Campione di compost	% di abbattimento di <i>Clostridium perfringens</i> nei terreni di coltura
1	99,9
2	99,9
3	99,6
4	99,5
5	95,0
6	99,7
7	99,5
8	93,0
9	95,0
10	98,0
Media	97,9
Minimo	93,0
Massimo	99,9

5.2. Presenza di altri parametri microbiologici e verifica delle correlazioni

Nelle Tabelle C1-C3 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche effettuate per la ricerca dei parametri Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, *Salmonella*, *Escherichia coli*, oltre a *Clostridium perfringens* nei campioni di compost.

I dati risultanti dalle analisi effettuate per la ricerca dei parametri Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, oltre a *Clostridium perfringens* nei campioni di acque reflue sono riportati nelle Tabelle C4-C6.

Nelle Tabelle C7-C8 sono riportati i coefficienti di correlazione calcolati confrontando i valori di *Clostridium perfringens* rispetto a tutti i parametri considerati.

Valori elevati di concentrazione sono stati ottenuti per i classici parametri indicatori di contaminazione, Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali ed *Escherichia coli* in tutti i campioni prelevati presso gli impianti di compostaggio per quanto riguarda la miscela di materie prime (C1).

Il patogeno *Salmonella* è stato rilevato analogamente in tutti i campioni della fase C1, anche in concentrazioni elevate.

Dalle Tabelle C2 e C3 si evidenzia, comunque, una riduzione delle densità batteriche per tutti i parametri considerati che conferma, analogamente al parametro *Clostridium perfringens*, un abbattimento nel corso delle varie fasi di trattamento fino al prodotto finale (C3).

Nella Tabella C7 sono riportati i valori dei coefficienti di correlazione [r] calcolati per tutti i parametri considerati (*Clostridium perfringens*, Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, *Salmonella*, *Escherichia coli*) sulla base dei risultati ottenuti nelle diverse fasi operative di produzione del compost.

Correlazioni statisticamente significative ($p > 0,05$) sono state evidenziate tra *Clostridium perfringens* e il patogeno *Salmonella* ($r = 0,723$; $p > 0,05$) e gli indicatori Coliformi totali ($r = 0,739$; $p > 0,05$).

Valori di concentrazione elevati sono stati riscontrati per tutti gli indicatori nei campioni di acque reflue all'entrata all'impianto di depurazione (A1): Coliformi totali (media N [\log_{10}] 7,6), Coliformi fecali (media N [\log_{10}] 7,0), Streptococchi fecali (media N [\log_{10}] 6,5), *Escherichia coli* (media N [\log_{10}] 5,6) (Tabella C4). Sono stati inoltre rilevate anche alte concentrazioni dei patogeni *Salmonella* e *Giardia* e valori relativamente più ridotti per il protozoo coccide *Cryptosporidium* (Tabella C4).

Nella fase A2 (dopo trattamento secondario) i campioni analizzati hanno fornito ancora valori elevati di concentrazione microbica per tutti i parametri considerati (Tabella C5), mentre un abbattimento, analogamente alla riduzione delle densità di *Clostridium perfringens*, è stato osservato per gli stessi parametri rilevati nella fase C3, dopo disinfezione, con una media di circa 3 – 4 ordini di grandezza sia per gli indicatori, sia per i patogeni (Tabella C6).

Nella Tabella C8 relativa al calcolo dei coefficienti di correlazione, si osserva che una correlazione diretta statisticamente significativa, è stata calcolata tra *Clostridium perfringens* e Coliformi fecali ($r = 0,825$; $p > 0,01$ e $0,05$), mentre una correlazione inversa è stata ottenuta tra i valori di *Clostridium perfringens* e *Salmonella* ($r = - 0,693$; $p > 0,05$).

6. VALUTAZIONE DEI DATI OTTENUTI

La ricerca di *Clostridium perfringens* non rientrava, fino a non molto tempo fa, tra le determinazioni da effettuare in campioni ambientali per la valutazione della loro qualità. Solo recentemente la sua ricerca è stata stabilita per la determinazione della qualità delle acque destinate al consumo umano ed è inserita nella Direttiva Europea (83/98/CE) che è stata recepita in Italia con il DL.vo n. 31 del 2001 (40).

Nella nuova normativa italiana il parametro, andrà a sostituire, nell'elenco dei parametri stabiliti per legge, l'indicatore clostridi solfitoriduttori, gruppo di microrganismi più eterogeneo, ma meno specifico nel segnalare la presenza di eventuale contaminazione di origine fecale.

In relazione alla sua valenza sanitaria e alle sue caratteristiche di indicatore specifico di contaminazione fecale e di qualità dei trattamenti, è auspicabile anche il suo inserimento nella normativa, in corso di revisione, riguardante i prodotti ammendanti e quindi i prodotti di compostaggio.

La sua caratteristica di indicatore di contaminazione fecale, abbinata alla sua maggiore capacità di sopravvivenza nell'ambiente sotto forma di spore, lo rende un parametro particolarmente valido per la determinazione della qualità di matrici ambientali in cui gli altri indicatori di contaminazione fecale vengono più facilmente eliminati.

Trattamenti di disinfezione, trattamenti termici, presenza di sostanze tossiche, sono condizioni altamente sfavorevoli alla sopravvivenza di batteri in forma vegetativa, mentre sono condizioni che possono permettere ancora la sopravvivenza di forme di resistenza e di organismi meno sensibili alle condizioni ostili del mezzo. Come è noto virus, cisti e oocisti di protozoi patogeni sono in grado di sopravvivere ai trattamenti di potabilizzazione e di depurazione delle acque e, superando quindi le barriere sanitarie, possono diffondersi nell'ambiente e costituire un rischio per la salute delle popolazioni. A questo proposito *Clostridium perfringens* è stato proposto come indicatore di efficienza di trattamento da Payment e Franco (13) per la sua capacità di essere correlato alle concentrazioni di virus ($r = 0,63$; $p = 0,001$), *Cryptosporidium* ($r = 0,65$; $p = 0,002$) e *Giardia* ($r = 0,76$; $p = 0,001$), rilevate dopo trattamento di acque da utilizzare a scopo potabile.

La capacità del microrganismo di fornire indicazioni sulla inattivazione di organismi particolarmente resistenti può anche, quindi, essere sfruttata per valutare la rimozione di eventuali patogeni resistenti e presenti in matrici quali compost, ammendante spesso derivato anche dall'uso di fanghi di depurazione che notoriamente concentrano, durante il trattamento delle acque reflue, tutti gli organismi presenti.

I dati ottenuti dalla ricerca effettuata hanno evidenziato percentuali elevate di abbattimento di *Clostridium perfringens* nei campioni di compost maturo, con valori massimi del 99,9%. Per quanto riguarda questa matrice non risulta che esistano dati da confrontare con quelli ottenuti nel corso dello studio, ma si può supporre che, in condizioni operative ottimali di produzione del compost, la percentuale di inattivazione del microrganismo possa raggiungere valori elevati. Ciò può fare ipotizzare un'analogia inattivazione per tutti quegli organismi in grado di sopravvivere più a lungo nell'ambiente rispetto a forme microbiche più sensibili.

Analogamente per questa matrice non esistono dati relativi alla ricerca di tutti i parametri microbiologici qui esaminati. In particolare non risulta che sia mai stato ricercato in campioni di compost *Escherichia coli*, indicatore primario di contaminazione fecale, che rappresenta un parametro che sta, negli ultimi tempi, acquisendo sempre maggiore importanza e va, in alcune nuove direttive europee e nazionali, a sostituirsi ai più storici indicatori Coliformi fecali.

Particolare importanza assume il trattamento del compost, sia in funzione dell'acquisizione delle caratteristiche proprie dell'ammendante, sia in relazione alla sua "igienizzazione". Infatti, la struttura solida particellare del materiale da trattare può comportare difficoltà nell'eliminazione dei microrganismi presenti, poiché, adesi e inglobati nelle particelle solide, hanno maggiori capacità di resistenza e sopravvivenza ai trattamenti. Nasce da qui la necessità di utilizzare indicatori di trattamento efficienti e validi, in grado di dimostrare significativamente l'avvenuta "igienizzazione" del prodotto.

Analoghe considerazioni possono essere fatte per quanto riguarda i trattamenti delle acque. I risultati ottenuti hanno dimostrato, in modo univoco, l'efficienza del trattamento delle acque reflue sottoposte a disinfezione. I valori ottenuti nel corso della ricerca sono equiparabili a quelli ottenuti da altri autori, in condizioni similari per tutti i parametri considerati (22-24).

È da evidenziare che la ricerca ha compreso anche il rilevamento dei protozoi *Giardia* e *Cryptosporidium*, organismi parassiti finora raramente ricercati nelle acque nel territorio italiano, ma indicati dall'OMS come patogeni emergenti a diffusione idrica.

Il calcolo delle eventuali correlazioni tra il parametro oggetto del nostro studio, *Clostridium perfringens*, ha fornito risultati che in parte confermano dati presenti in letteratura, ma che negli stessi studi in materia risultano non sempre concordanti (2, 13, 39).

Infatti correlazioni statisticamente significative sono state calcolate tra *Clostridium perfringens* e *Salmonella* e Coliformi totali e fecali nei campioni di acque reflue e compost.

Le difficoltà riscontrate per ottenere un maggior numero di parametri correlati con *Clostridium perfringens* può in parte venire anche ascritta ai limiti dei metodi analitici che notoriamente non sono in grado di mettere in evidenza tutta la popolazione microbica che si sta ricercando, fornendo quindi conteggi che rappresentano una frazione della popolazione reale presente.

Si ritiene comunque che resti valida l'ipotesi che le densità delle forme di resistenza (spore) di *Clostridium perfringens* possano essere significativamente associate a quelle di organismi particolarmente resistenti alle condizioni avverse del mezzo.

La positiva associazione tra *Clostridium perfringens* e indicatori di contaminazione (Coliformi totali e fecali), nonché *Salmonella* riscontrata nell'ambito di questa ricerca dimostra comunque l'esistenza di una valenza significativa di *Clostridium perfringens* nel fornire indicazioni circa una contaminazione di origine fecale.

Per quanto riguarda il metodo analitico utilizzato per la ricerca di *Clostridium perfringens*, risulta, dall'esame dei valori riscontrati nelle analisi di tutti i campioni esaminati, che il terreno SPS fornisce una stima numerica inferiore a quella ottenuta sul terreno OPSP. Tuttavia, dai risultati ottenuti dalle successive identificazioni delle colonie isolate dai due terreni, è stata riscontrata una indubbia maggiore capacità di selezionare il microrganismo ricercato da parte del terreno SPS.

La maggiore quantità di colonie riscontrate sul terreno OPSP è dovuta al fatto che, essendo meno selettivo, esso consente la crescita anche di colonie non appartenenti alla specie *Clostridium perfringens*. Molte delle colonie selezionate al primo screening risultava che potessero appartenere al genere *Bacillus*. Inoltre la minore selettività del terreno OPSP può già essere ipotizzata sulla base dei risultati ottenuti durante l'incubazione delle semine effettuate. Infatti, si può pensare che almeno una parte dei microrganismi, che erano in grado di crescere più rapidamente (entro le 24 ore di incubazione) e che hanno formato, quindi, colonie sull'OPSP e non sul SPS, non appartenessero alla specie ricercata che invece, probabilmente, cresce più lentamente (entro le 48 ore), come si è poi evidenziato dai risultati ottenuti su SPS.

L'SPS si è anche dimostrato un terreno più agevole nell'uso di routine di laboratorio, in quanto non necessita di supplementi, come nel caso del terreno OPSP, e quindi la procedura analitica ha costi di preparazione inferiori e tempi più rapidi.

CONCLUSIONI

Clostridium perfringens, per la sua capacità di formare spore resistenti alle condizioni ostili del mezzo, può essere utilizzato per segnalare l'efficienza dei trattamenti di depurazione delle acque, ma anche di trattamenti termici.

Si ritiene auspicabile il suo inserimento tra i parametri microbiologici da ricercare per la definizione della qualità di prodotti di compostaggio, in quanto microrganismo sicuramente più significativo di altre forme microbiche più sensibili al calore e quindi più facilmente eliminabili rispetto a patogeni presenti nella matrice con forme di resistenza (cisti, oocisti, ecc.).

Nonostante le difficoltà incontrate per stabilire un'associazione tra le sue concentrazioni e quelle di altri parametri microbiologici, valori significativi di correlazione sono stati calcolati tra questo parametro e il patogeno *Salmonella* e gli indicatori di contaminazione Coliformi totali e fecali, a conferma della capacità di *Clostridium perfringens* di costituire un buon indice di presenza di condizioni di fecalizzazione e comunque di presenza di batteri di origine enterica.

Rimane tuttavia valida, e comunque da accertare con ulteriori ricerche, l'ipotesi della capacità delle spore del microrganismo di segnalare la presenza di organismi particolarmente resistenti alle condizioni ambientali avverse e ai trattamenti di depurazione e disinfezione delle acque.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che, nella gran parte dei casi, le condizioni operative di produzione del compost sono in grado di ridurre le concentrazioni. I risultati ottenuti potrebbero anche risultare utili per l'individuazione di un valore soglia al di sopra del quale si evidenzia una scarsa efficienza del trattamento e quindi un prodotto di bassa qualità che può costituire un rischio per la salute in fase di manipolazione e spandimento sul suolo.

Il metodo che utilizza il terreno colturale SPS si è dimostrato semplice, affidabile, economico, veloce e applicabile a tutti i campioni ambientali esaminati; ha dato ottimi risultati sia nella resa numerica, che nella selettività per *Clostridium perfringens*.

Si ritiene che la tecnica adottata possa essere uno strumento idoneo al reperimento di *Clostridium perfringens* nel corso delle analisi di routine per la tipologia di campioni analizzati in questo studio. Infatti l'uso di procedure rapide e precise, che permettono di ottenere risultati attendibili, costituisce un fattore fondamentale quando da un controllo dipende una decisione di intervento ambientale, soprattutto se di interesse sanitario.

BIBLIOGRAFIA

1. Checcacci L, Meloni C, Pelissero G. *Igiene*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 1997.
2. Bisson JW, Cabelli VJ. *Clostridium perfringens* as a water pollution indicator. *Journal of Water Pollution Control Federation* 1980;52: 41-8.
3. Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. A handbook on the biology of Bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. London: Springer-Verlag; 1991.
4. Smith LDS, Gardner MV. The occurrence of vegetative cells of *Clostridium perfringens* in soil. *Journal of Bacteriology* 1949;58:407-8.
5. Akama L, Otani S. *Clostridium perfringens* as the flora intestine of healthy persons. *Japan Jour. Medicin Science and Biology* 1970;23:161-75.
6. Haenal H. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. *American Journal of Clinical Nutrition* 1970;23:433-42.
7. Matches JR, Liston J, Curran D. *Clostridium perfringens* in the environment. *Applied Microbiology* 1974;28:655-60.
8. Ando Y, Tsuzuki T, Sunagawa H, Oka S. Heat resistance, spore germination, and enterotoxigenicity of *Clostridium perfringens*. *Microbiology and immunology* 1985;29(4):317-26.
9. Garcia-Alvarado JS, Rodriguez MA, Labbe RG. Influence of elevated temperature on starch hydrolysis by enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* type A. *Applied and Environmental Microbiology* 1992;58:326-30.
10. Weiss KF, Strong DH. Some properties of heat-resistant and heat-sensitive strains of *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* 1967; 93:21-6.
11. Yamagishi T, Ishida S, Nishida S. Isolation of toxigenic strains of *Clostridium perfringens* from soil. *Journal of Bacteriology* 1964;88:646-52.
12. Brock TD, Madigan MD, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia*. Bologna: Città Studi Edizioni; 1999.
13. Payment P, Franco E. *Clostridium perfringens* and somatic Coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology* 1993;59:2418-24.
14. Sorensen DL, Eberl SG, Dickson RA. *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-point polluted stream. *Water Research* 1989;23:191-7.
15. Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews* 1990;3:67-8.
16. Prescott SC, Winslow CA, Mc Crady M. *Water bacteriology*. New York: John Wiley and Sons, Inc; 1945.
17. Davies CM, Long JA, Donald M, Ashbolt NJ. Survival of fecal microorganisms in aquatic sediments of Sidney, Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 1995;61:1888-96.
18. Leeming R, Nichols PD, Ashbolt NJ. Distinguishing sources of fecal pollution. *Water Services Association of Australia, Melbourne, Research Report* 1998; 204:46-51.
19. Bonadonna L, Dal Cero C, Liberti R, Pirrera A, Santamaria F, Volterra L. *Clostridium perfringens* come indicatore in sedimenti marini. *Ingegneria Sanitaria-Ambientale* 1993;1:28-30.
20. Emerson DJ, Cabelli VJ. Extraction of *Clostridium perfringens* spores from bottom sediments samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982;44:1144-9.
21. Bonadonna L, Di Girolamo I, Liberti R. Studio preliminare sulle acque e sui sedimenti del Fiume Arrone (Roma). *Aspetti microbiologici. Acqua Aria* 1995;3:315-8.

22. Hirata T, Kawamura K, Sonoki S, Hirata K, Kaneko M, Taguchi K. *Clostridium perfringens*, as an indicator microorganism for the evaluation of the effect of wastewater and sludge treatment system. *Wat. Sci. Tech.* 1991;24:367-72.
23. Rippey SR, Watkins WD. Comparative rates of disinfection of microbial indicator organisms in chlorinated sewage effluents. *Water Science and Technology.* 1992;26:2185-9.
24. Venczel LV, Arrowood M, Hurd M, Sobsey MD. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 1997;63:1598–1601.
25. Leeming R, Ball A, Ashbolt NJ, Nichols P. Distinguishing between human and animal sources of fecal pollution. *Chemistry in Australia* 1996;61:434-5.
26. Cardillo GMG. Il compostaggio: sistemi di processo e sue applicazioni. *Biologi Italiani* 1999; 9:47-50.
27. Landi E. Sprechi e risorse: il problema “acqua”. *Biologi Italiani* 1999;3:3.
28. Di Pinto AC, Floccia M, Sanna M. *La depurazione degli scarichi*. Roma: Edizioni delle Autonomie; 1988.
29. Yaziz MI, Lloyd BJ. The removal of Salmonellas in conventional sewage treatment process. *Journal of Applied Bacteriology* 1979;46:131-7.
30. Marzouk Y, Goyal SM, Gerba CP. Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater Israel. *Water Resources* 1980;14:1585-90.
31. Clarke NA, Stevenson RE, Chany SL, Klaber PW. Removal of enteric viruses from sewage by activated sludge treatment. *American Journal Public Health Association* 1961;51:1118-24.
32. Italia. Legge 10/05/1976 n. 319. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 141, 29 maggio 1976.
33. Italia. Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e reperimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario* n. 101/L, 29 maggio 1999.
34. Bonadonna L, Ottaviani M (Ed.). *Metodi di analisi per le acque destinate al consumo umano*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti ISTISAN 97/8).
35. Bonadonna L, Ottaviani M (Ed.). *Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano. Volume 2. Parte 2. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/14 Pt. 2).
36. Craven SE, Blankenship LC. Changes in the hydrophobic characteristics of *Clostridium perfringens* spores and spore coats by heat. *Canadian Journal of Microbiology* 1987; 33:773-6.
37. Nishida S, Seo N, Nakagawa M. Sporulation, heat resistance, and biological properties of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 1969; 17:303-9.
38. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJ. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1992.
39. Conio O, Palumbo F, Borelli E, Pignata C, Gilli G, Carraro E. Contaminazioni da *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle acque destinate al consumo umano in Italia. *L'Igiene Moderna* 2000; 144:77-100.
40. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 52, 3 marzo 2001. *Supplemento Ordinario* n. 41/L.

APPENDICE A
Dati relativi alla presenza di *Clostrium perfringens*
nei campioni di compost

Si danno di seguito i risultati delle analisi microbiologiche relative alla ricerca di *Clostridium perfringens* per i diversi campioni di compost. Le concentrazioni del microrganismo sono riferite a grammo di sostanza secca.

Le abbreviazioni utilizzate sono:

g_{ss} = grammo di sostanza secca

C1 = miscela di materie prime in ingresso all'impianto

C2 = miscela di prodotti intermedi

C3 = compost maturo di processo

- = nessuna successiva incubazione

Tabella A1. Compost: campione 1. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	200 x 10 ²	400 x 10 ²	900 x 10 ²	3000 x 10 ²
C2	100 x 10 ²	2000 x 10 ²	400 x 10 ²	600 x 10 ²
C3	5 x 10 ²	7 x 10 ²	1 x 10 ²	2 x 10 ²

Tabella A2. Compost: campione 2. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	< 1	500 x 10 ³	1000 x 10 ³	-
C2	< 1	300 x 10 ³	200 x 10 ³	600 x 10 ³
C3	< 1	100 x 10 ³	1 x 10 ³	3 x 10 ³

Tabella A3. Compost: campione 3. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	200 x 10 ³	900 x 10 ³	800 x 10 ³	900 x 10 ³
C2	20 x 10 ³	100 x 10 ³	20 x 10 ³	600 x 10 ³
C3	< 1	70 x 10 ³	2 x 10 ³	100 x 10 ³

Tabella A4. Compost: campione 4. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	60 x 10 ²	60 x 10 ²	10000 x 10 ²	-
C2	< 1	7 x 10 ²	200 x 10 ²	400 x 10 ²
C3	< 1	< 1	1 x 10 ²	20 x 10 ²

Tabella A5. Compost: campione 5. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore).

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	40 x 10 ³	400 x 10 ³	100 x 10 ³	-
C2	< 1	100 x 10 ³	8 x 10 ³	300 x 10 ³
C3	< 1	4 x 10 ³	5 x 10 ³	100 x 10 ³

Tabella A6. Compost: campione 6. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	< 1	600 x 10 ³	700 x 10 ³	-
C2	< 1	100 x 10 ³	6 x 10 ³	300 x 10 ³
C3	< 1	2 x 10 ³	< 1	200 x 10 ³

Tabella A7. Compost: campione 7. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	< 1	800 x 10 ³	100 x 10 ³	2000 x 10 ³
C2	< 1	400 x 10 ³	100 x 10 ³	600 x 10 ³
C3	< 1	100 x 10 ³	2 x 10 ³	200 x 10 ³

Tabella A8. Compost: campione 8. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	10 x 10 ⁴	200 x 10 ⁴	100 x 10 ⁴	-
C2	6 x 10 ⁴	60 x 10 ⁴	20 x 10 ⁴	60 x 10 ⁴
C3	< 1	20 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	50 x 10 ⁴

Tabella A9. Compost: campione 9. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	1 x 10 ³	70 x 10 ³	50 x 10 ³	-
C2	< 1	< 1	5 x 10 ³	90 x 10 ³
C3	< 1	< 1	2 x 10 ³	20 x 10 ³

Tabella A10. Compost: campione 10. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Compost	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> / g _{ss}			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
C1	4 x 10 ³	40 x 10 ³	100 x 10 ³	-
C2	< 1	< 1	10 x 10 ³	20 x 10 ³
C3	< 1	< 1	6 x 10 ³	20 x 10 ³

APPENDICE B
Dati relativi alla presenza di *Clostrium perfringens*
nei campioni di acque reflue

Si danno di seguito i risultati delle analisi microbiologiche reattive alla ricerca di *Clostridium perfringens* per i diversi campioni acque reflue. Le concentrazioni del microorganismo sono riferite a 100 ml di campione analizzato

Le abbreviazioni utilizzate sono:

A1 = acqua grezza all'entrata

A2 = acqua dopo trattamento secondario

A3 = acqua dopo disinfezione con sodio ipoclorito

- = nessuna successiva incubazione

Tabella B1. Acque reflue: campione 1. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	4×10^2	4×10^2	100×10^2	200×10^2
A2	< 1	5×10^2	7×10^2	10×10^2
A3	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabella B2. Acque reflue: campione 2. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	4×10^1	60×10^1	100×10^1	200×10^1
A2	< 1	2×10^1	10×10^1	10×10^1
A3	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabella B3. Acque reflue: campione 3. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	400×10^1	1000×10^1	6000×10^1	-
A2	70×10^1	70×10^1	100×10^1	100×10^1
A3	1×10^1	4×10^1	60×10^1	100×10^1

Tabella B4. Acque reflue: campione 4. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	700 x 10 ¹	1000 x 10 ¹	1000 x 10 ¹	2000 x 10 ¹
A2	90 x 10 ¹	90 x 10 ¹	100 x 10 ¹	300 x 10 ¹
A3	< 1	5 x 10 ¹	20 x 10 ¹	20 x 10 ¹

Tabella B5. Acque reflue: campione 5. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	500 x 10 ¹	1000 x 10 ¹	800 x 10 ¹	5000 x 10 ¹
A2	100 x 10 ¹	300 x 10 ¹	500 x 10 ¹	700 x 10 ¹
A3	1 x 10 ¹	50 x 10 ¹	100 x 10 ¹	100 x 10 ¹

Tabella B6. Acque rquieflue: campione 6. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	400 x 10 ¹	2000 x 10 ¹	6000 x 10 ¹	-
A2	40 x 10 ¹	100 x 10 ¹	60 x 10 ¹	300 x 10 ¹
A3	< 1	6 x 10 ¹	40 x 10 ¹	60 x 10 ¹

Tabella B7. Acque reflue: campione 7. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	30 x 10 ²	400 x 10 ²	1000 x 10 ²	-
A2	10 x 10 ²	10 x 10 ²	50 x 10 ²	60 x 10 ²
A3	< 1	2 x 10 ²	7 x 10 ²	9 x 10 ²

Tabella B8. Acque reflue: campione 8. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	40×10^2	60×10^2	100×10^2	200×10^2
A2	7×10^2	10×10^2	10×10^2	50×10^2
A3	1×10^2	4×10^2	10×10^2	10×10^2

Tabella B9. Acque reflue: campione 9. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	5×10^1	40×10^1	40×10^1	70×10^1
A2	10×10^1	20×10^1	20×10^1	60×10^1
A3	< 1	2×10^1	1×10^1	6×10^1

Tabella B10. Acque reflue: campione 10. Numero di colonie di *Clostridium perfringens* isolate sui terreni colturali SPS e OPSP con due differenti tempi di incubazione (24 e 48 ore)

Acque reflue	N. di colonie di <i>Clostridium perfringens</i> /100 ml			
	SPS		OPSP	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A1	300×10^1	500×10^1	700×10^1	1000×10^1
A2	40×10^1	80×10^1	200×10^1	300×10^1
A3	4×10^1	10×10^1	100×10^1	100×10^1

APPENDICE C
Dati relativi alla presenza
di altri parametri microbiologici
nel compost e nelle acque reflue

Si forniscono di seguito i risultati delle analisi microbiologiche e parassitologiche per i diversi campioni di compost e di acqua reflua analizzati (Tabelle C1-C6). Sono inoltre riportati i coefficienti di correlazione tra i parametri considerati per i campioni di compostaggio (Tabella C7) e per i campioni di acqua reflua (Tabelle C8).

Le abbreviazioni utilizzate sono:

- A1 = acqua grezza all'entrata
- A2 = acqua dopo trattamento secondario
- A3 = acqua dopo disinfezione con sodio ipoclorito
- C1 = miscela di materie prime in ingresso all'impianto
- C2 = miscela di prodotti intermedi
- C3 = compost maturo di processo
- CP = *Clostridium perfringens*
- CT = Coliformi Totali
- CF = Coliformi Fecali
- EC = *Escherichia coli*
- g_{ss} = grammo di sostanza secca
- SF = Streptococchi Fecali
- SAL = *Salmonella*
- GI = *Giardia*
- CR = *Cryptosporidium*

Tabella C1. Compost (C1): numero di colonie dei diversi parametri considerati isolate dai campioni di miscela di materie prime in ingresso all'impianto per ogni campionamento

Campione di compost	N. [\log_{10}] di colonie/g _{ss}					
	CP	CT	CF	SF	SAL	EC
1	4,60	8,26	5,58	6,99	1,48	4,41
2	5,70	5,56	5,36	5,84	1,64	4,54
3	5,95	7,83	5,83	7,20	4,20	5,83
4	3,78	4,93	4,60	5,78	2,30	3,70
5	5,60	5,28	3,90	5,28	2,60	1,79
6	5,78	3,63	4,23	5,30	4,30	4,23
7	5,90	5,36	5,36	4,36	4,36	4,36
8	6,30	5,40	4,92	5,65	2,90	4,18
9	4,85	3,90	2,90	5,48	0,90	2,90
10	4,60	3,87	2,87	5,15	0,85	2,87

Tabella C2. Compost (C2): numero di colonie dei diversi parametri considerati isolate dai campioni di miscela di prodotti intermedi per ogni campionamento

Campione di compost	N. [\log_{10}] di colonie/g _{ss}					
	CP	CT	CF	SF	SAL	EC
1	5,30	5,82	2,40	4,48	0,00	2,00
2	5,48	5,48	4,48	4,48	0,78	4,48
3	5,00	4,48	3,48	4,34	0,30	3,48
4	2,85	3,81	2,65	4,26	1,34	2,65
5	5,00	4,18	0,48	3,18	1,48	0,00
6	5,00	5,20	5,20	3,49	3,20	5,20
7	5,60	5,34	5,34	4,34	1,78	4,97
8	5,78	4,43	2,18	4,30	1,54	3,86
9	0,00	2,68	0,70	2,18	0,00	0,70
10	0,00	2,59	0,60	4,78	0,78	0,60

Tabella C3. Compost (C3): numero di colonie dei diversi parametri considerati isolate dai campioni di compost maturo), per ogni campionamento

Campione di compost	N. [\log_{10}] di colonie/g _{ss}					
	CP	CT	CF	SF	SAL	EC
1	2,85	2,26	1,08	2,26	0,00	0,70
2	5,00	2,30	2,65	3,11	0,48	2,40
3	4,85	2,54	2,00	3,41	0,00	2,00
4	0,00	3,41	2,95	4,41	1,00	2,53
5	3,60	3,15	2,15	2,15	1,30	1,43
6	3,30	3,92	2,30	3,43	3,30	2,30
7	5,00	4,32	4,32	4,32	0,78	4,32
8	5,30	2,28	2,00	2,40	1,00	2,32
9	0,00	0,60	0,00	0,30	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	1,60	0,00	0,00

Tabella C4. Acque reflue (fase A1): numero di colonie dei diversi parametri considerati isolate dai campioni di acqua grezza all'entrata dell'impianto, per ogni campionamento

Campione di acque reflue	N. [\log_{10}] di colonie /l							
	CP	CT	CF	SF	SAL	EC	GI	CR
1	4,60	7,30	6,70	6,70	5,62	6,30	4,08	3,00
2	3,78	8,70	7,62	7,78	5,78	5,70	4,40	3,00
3	5,00	7,60	7,93	6,72	4,85	5,30	4,54	2,90
4	5,00	7,91	7,67	6,88	5,48	6,62	4,48	2,78
5	5,00	7,66	6,95	6,60	4,30	6,08	3,76	2,65
6	5,30	6,87	7,30	6,08	4,36	5,15	3,49	0,00
7	5,60	8,85	6,48	6,36	4,32	5,36	4,18	3,08
8	4,78	6,78	6,85	6,15	5,60	5,43	4,40	0,00
9	3,60	5,48	4,43	4,40	4,95	2,76	3,96	1,60
10	4,70	8,78	8,05	7,46	7,51	7,70	4,35	2,04

Tabella C5. Acque reflue (fase A2): numero di colonie dei diversi parametri considerati isolate dai campioni dopo trattamento secondario, per ogni campionamento

Campione di acque reflue	N. [\log_{10}] di colonie /l							
	CP	CT	CF	SF	SAL	EC	GI	CR
1	3,70	5,78	5,00	4,85	3,70	5,00	2,48	2,59
2	2,30	6,54	6,00	5,30	3,48	4,60	3,49	2,63
3	3,85	6,38	6,00	4,48	3,70	4,78	3,32	2,34
4	3,95	6,48	6,30	5,70	4,00	5,78	3,63	2,18
5	4,48	5,30	6,70	5,30	4,30	4,08	2,79	2,32
6	4,00	6,70	6,48	5,48	4,36	4,65	3,23	0,00
7	4,00	6,78	6,36	4,30	4,15	2,81	3,18	2,70
8	4,00	7,60	6,08	6,34	2,98	3,62	3,40	0,00
9	3,30	5,46	3,18	3,17	3,70	2,26	2,78	1,54
10	3,90	4,65	3,79	2,93	2,86	3,38	2,62	0,95

Tabella C6. Acque reflue (fase A3): numero di colonie dei diversi parametri considerati isolate dai campioni dopo disinfezione con sodio ipoclorito, per ogni campionamento

Campione di acque reflue	N. [\log_{10}] di colonie /l							
	CP	CT	CF	SF	SAL	EC	GI	CR
1	0,00	3,00	2,70	2,70	2,60	3,30	0,30	0,00
2	0,00	3,00	2,48	2,00	3,70	2,30	0,70	0,78
3	2,60	2,46	1,48	2,70	2,90	0,70	0,48	0,00
4	2,70	2,70	2,18	3,30	1,08	1,36	0,00	0,30
5	3,70	3,18	2,78	3,18	2,18	3,60	1,11	0,60
6	2,78	3,15	2,65	3,36	3,60	3,08	1,04	0,00
7	3,30	2,99	1,72	2,99	3,11	1,32	0,85	0,30
8	3,60	2,88	2,81	3,85	1,40	2,95	0,95	0,00
9	2,30	4,15	0,00	0,00	2,48	0,00	1,08	0,48
10	3,00	1,85	0,00	0,00	1,18	0,00	0,48	0,00

Tabella C7. Compost: coefficiente di correlazione tra *Clostridium perfringens* e i parametri considerati per campioni di compostaggio

Parametro	Valori di correlazione [r]		
	C1	C2	C3
	CP	CP	CP
CP	1	1	1
CT	0,274	0,739*	0,345
CF	0,409	0,455	0,421
SF	0,012	0,241	0,295
SAL	0,732*	0,396	0,287
EC	0,432	0,591	0,562

* = correlazione significativa $p > 0,05$

Tabella C8. Acque reflue: coefficienti di correlazione tra *Clostridium perfringens* e i parametri considerati per campioni di acqua

Parametro	Valori di correlazione [r]		
	A1	A2	A3
	CP	CP	CP
CP	1	1	1
CT	0,313	0,239	-0,110
CF	0,117	0,825**	0,299
SF	-0,178	0,382	0,535
SAL	-0,693*	0,528	-0,383
EC	-0,117	-0,080	0,183
GI	-0,062	0,067	0,457
CR	0,074	-0,302	-0,085

* = correlazione significativa $p > 0,05$

** = correlazione significativa $p > 0,01$

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*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, marzo 2002 (n. 1) 9° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*