

VALUTAZIONE DI EMISSIONE E DISPERSIONE DI BIOAEROSOL DA UN IMPIANTO DI BIOTRATTAMENTO DI SEDIMENTI CONTAMINATI

Valentina Bertolini*¹, Isabella Gandolfi¹, Roberto Ambrosini¹, Maddalena Papacchini², Giuseppina Bestetti¹, Andrea Franzetti¹

1. Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio e di Scienze della Terra - Università degli Studi di Milano Bicocca

2. INAIL - Settore Ricerca, Certificazione e Verifica – DIPIA, Roma, Italia

Sommario - Il bioaerosol è costituito da cellule batteriche, funghi, virus, pollini e residui vegetali ed è un potenziale fattore di rischio per la salute umana. Tale rischio è potenzialmente elevato in ambienti che facilitano la risospensione e la diffusione di queste particelle, come ad esempio gli impianti di trattamento di rifiuti e di acque reflue. I lavoratori e i residenti in zone limitrofe a tali attività sono le categorie di persone che subiscono il più alto rischio d'inalazione. La valutazione della dispersione di bioaerosol da sorgenti puntiformi è quindi importante per la tutela della salute pubblica.

In questo lavoro, è stato utilizzato un approccio molecolare ed è stato preso in esame un impianto di biorisanamento di sedimenti d'origine antropica. La particolarità di questo impianto è che il materiale trattato è di tipo solido, ma è affetto da contaminazione fecale, come avviene comunemente per le acque reflue, ed inoltre è contaminato da idrocarburi.

Lo scopo del lavoro è verificare se le diverse fasi del processo 1) influenzino in modo significativo la struttura delle comunità microbiche associate al particolato atmosferico; 2) aumentino l'esposizione dei lavoratori a potenziali batteri patogeni.

La struttura delle comunità batteriche è stata valutata mediante il sequenziamento del gene 16S per l'rRNA. La classificazione tassonomica ha mostrato che le comunità microbiche nell'aria durante le fasi di processo considerate (asciugatura, vagliatura e rivoltamento delle biopile) sono caratterizzate dalla presenza di *Actinomycetales*, *Bacillales*, e *Pseudomonadales*. In assenza di qualsiasi attività nell'impianto, invece, sono stati trovati prevalentemente *Bacillales* (13,5%), *Clostridiales* (17,7%), *Lactobacillales* (13,5%) e *Rhodobacterales* (16,3%).

L'analisi NMDS (Non-metric Multi-Dimensional Scaling) dei campioni di particolato aerodisperso e sedimento trattato ha mostrato che il processo di trattamento influenza la composizione delle comunità microbiche, probabilmente a causa dell'aerodispersione delle particelle.

La quantità totale di batteri e l'abbondanza dei principali indicatori fecali (*E. coli*, *Enterococcus sp.*, *Clostridium perfringens*) sono maggiori in campioni di aria raccolti durante i processi d'impianto rispetto a quelli raccolti in assenza di attività.

* Piazza della Scienza, 1, 20126 Milano Tel. 02/6448.2938 - Fax 02/6448.2994
valentina.bertolini@unimib.it

Parole chiave: comunità batteriche, atmosfera, PM, sorgente puntuale, sequenziamento, genoma

ASSESSMENT OF EMISSION AND DISPERSAL OF BIOAEROSOL FROM A CONTAMINATED SEDIMENT BIOTREATMENT PLANT

Abstract - Bioaerosol is constituted by bacterial cells, fungi, viruses, pollens and plant debris and may be considered as a potential source of pathogens and harmful agents. Bioaerosol's harmfulness is potentially high at sites that can facilitate aerosolization and spreading of these particles such as waste treatment plants. Workers and people living in the surroundings of these plants are the categories that suffer the highest risk of inhalation. The assessment of bioaerosol's emissions and dispersal from point sources is therefore important for the protection of public health.

In this work, we used a molecular approach and we considered a sediment treatment plant in which solid wastes of anthropogenic origin such as for example sediments from canals or sewers were collected, decontaminated and possibly reused in industry. The peculiarity of this plant was the bioremediation of solid material affected by fecal contamination, as commonly reported for wastewater, as well as by hydrocarbon contamination.

This work aimed at testing whether the different process phases 1) significantly affected the airborne microbial community structure and 2) increased the exposition of workers to potential pathogenic bacteria.

The bacterial community structure was assessed by the sequencing of 16S rRNA gene libraries through Illumina technology. The taxonomic classification showed that the airborne microbial communities during the considered plant activities (drying, sieving and biopile turning) were characterized by the presence of *Actinomycetales*, *Bacillales*, and *Pseudomonadales*. Conversely, when the plant was inactive, airborne microbial community structure showed rather high abundance of *Bacillales* (13.5%), *Clostridiales* (17.7%), *Lactobacillales* (13.5%) and *Rhodobacterales* (16.3%).

Non-metric Multi-Dimensional Scaling (NMDS) of both airborne particulate and treated sediment samples showed that treatment process actually influence the bacterial community composition, probably due to particle aero-dispersion.

The total amount of bacteria and the abundance of the main fecal indicators (*E. coli*, *Enterococcus sp.*, *Clostridium perfringens*) were higher in air samples collected during the plant processes than in those collected during plant inactivity.

Keywords: Airborne bacteria, PM, point source, atmosphere, next generation sequencing.

Ricevuto il 25-03-2015; Correzioni richieste il 14-05-2015; Accettazione finale il 21-05-2015.

1. INTRODUZIONE

Con il termine bioaerosol s'intende genericamente l'insieme delle particelle di origine biologica risospese in atmosfera. La natura di queste particelle può essere molto diversa: frammenti di materiale vegetale (foglie, corteccia, radici, fili d'erba), polline e allergeni, cellule batteriche o parti di esse, spore fungine ed acari (Polymenakou, 2012).

Ad oggi, il dibattito scientifico riguardo la presenza e l'attività delle popolazioni microbiche nel bioaerosol è ancora aperto. I dati riportati finora in letteratura non consentono di definire con certezza i consorzi microbici dell'aria come un vero e proprio ecosistema in cui avvengano cioè interazioni tra microorganismi e scambi di materia o energia con l'ambiente circostante; tuttavia si fa comunemente riferimento ad essi con il termine di comunità microbiche (Bertolini et al., 2013).

La presenza di tali comunità microbiche in atmosfera può avere diverse conseguenze. Da un lato, è possibile ipotizzare un ruolo positivo operato dai microorganismi nella detossificazione di molecole inquinanti. Tuttavia, al momento non sono disponibili dati che possano confermare questa ipotesi. Dall'altro, invece, è stata maggiormente investigata la possibilità che il bioaerosol costituisca un fattore di rischio per la salute dell'uomo. Infatti, è noto che esso possa causare direttamente o essere concausa d'irritazioni e infiammazioni dell'apparato respiratorio (Camatini et al., 2012).

Inoltre, esistono evidenze scientifiche che dimostrano il coinvolgimento di batteri in processi meteorologici, per esempio la condensazione delle nuvole o la formazione di piccoli aggregati di ghiaccio, fenomeno conosciuto come ice nucleation (Bowers et al., 2009; Zweifel et al., 2012). Infine, ormai molti studi mostrano come le strutture architettoniche possano subire danni anche significativi ad opera di microorganismi (Golubić et al., 2015). L'esposizione dell'uomo al bioaerosol è particolarmente marcata in alcuni ambienti di lavoro e residenziali. Le discariche, gli impianti di trattamento di rifiuti solidi e di acque reflue, gli impianti di compostaggio e gli alle-

vamenti sono tra le attività antropiche a più alto tasso di emissione di microorganismi (Brandl et al., 2005; Grisoli et al., 2009; Haas et al., 2009). Conseguentemente, i lavoratori ed i residenti in aree limitrofe a queste aziende sono tra le categorie maggiormente a rischio di esposizione. L'entità reale del rischio non è ancora stata determinata con esattezza. Ad oggi, infatti, non esistono norme riconosciute né a livello Nazionale né a livello Europeo che regolamentino le emissioni e la dispersione del bioaerosol (Domingo e Nadal 2009).

Per questi motivi, è particolarmente rilevante lo studio delle comunità batteriche associate al particolato atmosferico (PM) da sorgenti puntuali. Un'augmentata conoscenza della struttura di comunità e della quantità di batteri presenti in questi ambienti, infatti, potrebbe portare alla definizione esatta del rischio e all'individuazione di valori soglia utili per la promulgazione di leggi in merito.

La produzione scientifica in questo campo è molto grande; sono state trattate molte diverse sorgenti puntuali di bioaerosol, per esempio, impianti di trattamento di rifiuti urbani, di compostaggio, di trattamento delle acque reflue e allevamenti (Dungan, 2010; Korzeniewska, 2011; Wéry, 2014). I risultati ottenuti sono molto diversi e pare che la diversità delle comunità microbiche sia per lo più imputabile al tipo d'impianto e alla fase di processo considerati. Ciò può accadere, in generale, perché la composizione del bioaerosol subisce variazioni naturali durante le fasi di processo, ma più precisamente, perché in alcuni casi, ad esempio negli impianti di trattamento delle acque reflue, viene comunemente eseguita una procedura di disinfezione (di tipo chimico o fisico) volta ad eliminare i microorganismi dannosi, che quindi altera artificialmente la comunità microbica. Per questo motivo si sta cominciando a parlare di comunità microbiche impianto e/o processo specifiche. Ad esempio, per quanto riguarda il compostaggio, trattamento basato sulla degradazione biologica e sulla stabilizzazione della sostanza organica in condizioni aerobiche, la ricerca si è focalizzata su actinomiceti, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium sp.* in quanto sono stati riconosciuti essere le popolazioni coltivabili dominanti (Fischer et al., 1999; Millner et al., 1980).

Al contrario, in impianti di depurazione è stata trovata una grande varietà di microorganismi, tra cui i batteri dei generi *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella* e *Vibrio*, funghi filamentosi e inoltre numerosi lieviti (Korzeniewska, 2011 e riferimenti al suo interno). Pertanto, in base a questi risultati, i microorganismi fecali potrebbero rappresentare la fonte di contaminazione principale per gli impianti di trattamento delle acque reflue. Questo non sorprende se si tiene conto dell'origine del materiale trattato in questi impianti.

Dal punto di vista metodologico, la coltivazione è stata finora la metodica più utilizzata per individuare e quantificare i microorganismi. Solo recentemente e solo in alcuni casi, sono state introdotte tecniche non dipendenti da coltivazione, come ad esempio la PCR quantitativa (qPCR) o analisi dei geni che codificano per il 16S e 18S rRNA (Le Goff et al., 2011; Pankhurst et al., 2012). Nonostante il loro utilizzo ancora limitato, le tecniche molecolari permettono analisi più accurate sia in termini di descrizione delle comunità sia di quantificazione (Rinsoz et al., 2008). Quest'avanzamento è stato possibile grazie alla disponibilità di un sempre maggior numero di dati e ai continui progressi computazionali nell'analisi dei dati stessi (Claesson et al., 2010).

In questo lavoro, è stato usato utilizzato un approccio molecolare ed è stato preso in esame un impianto di trattamento rifiuti in cui sedimenti contaminati di origine antropica (provenienti ad esempio da canali o fognature) vengono raccolti, biorisanati e possibilmente riutilizzati nell'industria edile. La particolarità di questo impianto è che il materiale trattato è affetto da contaminazione fecale, come solitamente riportato per le acque reflue, oltre che da contaminazione da idrocarburi, che invece è più tipica in questo tipo di materiale.

La struttura delle comunità batteriche è stata valutata mediante il sequenziamento del gene 16S rRNA ottenuto mediante tecnologia Illumina, mentre la quantità totale di batteri è stata determinata attraverso qPCR. Infine, è stata stimata l'abbondanza assoluta dei principali indicatori fecali: *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*.

Lo scopo di questo lavoro è quindi quello di verificare se le diverse fasi del processo a) influenzino in maniera significativa la struttura delle comunità microbiche dell'atmosfera e b) incrementino l'esposizione dei lavoratori a potenziali batteri patogeni.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Descrizione dell'impianto e del processo di trattamento dei sedimenti contaminati

L'impianto di trattamento scelto si trova alla periferia del comune di Calcinatè (BG) (45° 37' 16.32 "N 9° 48' 01.08" E), situato a circa 50 km ad est di Milano. L'impianto è costituito da una superficie aperta ma coperta di 10648 m² in cui si effettua un processo di biorisanamento mediante biopile dinamiche su suolo e sedimenti. Il materiale trattato è principalmente di origine antropica ed è prelevato da canali o rogge. Prima del trattamento, i sedimenti si presentano generalmente umidi e con granulometria eterogenea. Le due fonti di contaminazione principale

sono quella fecale e quella da idrocarburi. Il trattamento consiste in tre fasi successive: 1) raccolta sedimenti e asciugatura; 2) vagliatura; 3) rivoltamento delle biopile. Durante quest'ultima fase si verifica l'effettivo processo di biorisanamento attraverso l'aerazione delle biopile. L'intera procedura ha una durata molto diversa a seconda delle caratteristiche dei sedimenti (umidità, livello di contaminazione, granulometria) e delle variabili meteorologiche (temperatura e umidità relativa). In genere un trattamento completo dura circa 3 mesi con un tempo in biopila medio di 40 giorni. Al termine del processo, il prodotto finale può essere riutilizzato per l'industria (ad esempio per la produzione di mattoni) o come pavimentazione o riempimento in discarica.

2.2 Campionamenti ed estrazione del DNA

Sono stati raccolti 36 campioni di PTS (Particolato Totale Sospeso) relativi alle varie fasi di processo (asciugatura, vagliatura e rivoltamento) e ad impianto fermo. La campagna di campionamento è durata da settembre 2013 ad aprile 2014 e lo schema di campionamento è riportato in Tabella 1. Tutti i campioni di PTS sono stati raccolti utilizzando un campionatore ad alto volume (ECHO Hi-Vol, TCR TECORA, Milano, Italia) su filtri in fibra di quarzo (Whatman, Maidstone, England) per 8 ore con velocità di flusso pari a 250 L min⁻¹.

L'estrazione del DNA è stata eseguita secondo il protocollo modificato del kit di estrazione del DNA FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), come riportato in Bertolini et al., (2013).

Accanto ai campioni di PTS, sono stati raccolti 21 campioni di sedimento (Tabella 1). L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il kit di estrazione FastDNA Spin kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA).

Al fine di valutare la potenziale influenza della sorgente sulle comunità batteriche dell'aria, 21 campioni (9 di PTS e 12 di sedimento) sono stati raccolti in corrispondenza delle diverse fasi di trattamento della medesima partita di sedimenti (vedi gli asterischi in Tabella 1).

2.3 Sequenziamento del gene 16S rRNA mediante Illumina MiSeq

Le regioni ipervariabili V5-V6 del gene 16S rRNA sono state amplificate mediante PCR. In breve, è stata effettuata una reazione di PCR utilizzando GoTaq[®] Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi: 783F e 1046R (Huber et al., 2007; Wang e Qian, 2009). I prodotti di PCR sono stati poi purificati mediante kit di purificazione Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-up (Promega

Tabella 1 – Campagna di campionamento. Gli asterischi indicano i campioni relativi allo stesso lotto di sedimentazione nelle diverse fasi di processo.

Impianto fermo	Aria			Sedimento		
	Asciugatura	Vagliatura	Rivoltamento	Asciugatura	Vagliatura	Rivoltamento
16.09.2013	20.01.2014	17.09.2013	18.09.2013	17.09.2013	17.09.2013	17.09.2013
10.02.2014	22.01.2014	29.10.2013	23.09.2013	17.09.2013	17.09.2013	16.04.2014*
11.02.2014	23.01.2014	30.10.2013	02.12.2013	30.10.2013	17.09.2013	18.04.2014*
	24.01.2014	31.10.2013	09.12.2013	17.01.2014	31.03.2014*	20.04.2014*
	03.03.2014*	04.11.2013	30.01.2014	17.01.2014	31.03.2014*	
	04.03.2014*	05.11.2013	16.04.2014*	05.03.2014*	01.04.2014*	
	05.03.2014*	08.11.2013	18.04.2014*	06.03.2014*	01.04.2014*	
	06.03.2014*	11.11.2013		10.03.2014*		
	10.03.2014*	12.11.2013		03.03.2014*		
		13.11.2013		04.03.2014*		
		21.11.2013				
		03.12.2013				
		10.12.2013				
		07.01.2014				
		17.01.2014				
		31.03.2014*				
		01.04.2014*				

Corporation, Madison, WI, USA). La quantità di DNA è stata misurata utilizzando un fluorimetro Qubit® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Il sequenziamento è stato effettuato presso il Parco Tecnologico Padano (Lodi, Italia) utilizzando la tecnologia Illumina MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) e un protocollo paired-end 250 bp x 2.

2.4 Elaborazione delle sequenze e analisi statistiche

È stato fatto il *demultiplexing* secondo gli indici delle *reads* ottenute dal sequenziamento. Per le successive elaborazioni è stata utilizzata la pipeline Uparse (Edgar 2013). Le *reads* forward e reverse con perfetta sovrapposizione sono state unite ed è stato applicato un filtro di qualità secondo i parametri di default. Le sequenze *singleton* (cioè quelle che appaiono solo una volta in tutta la serie di dati) sono state rimosse dall'intero dataset. Le Unità Tassonomiche Operative (OTUs) sono state definite raggruppando le sequenze con il 97% di somiglianza ed è stata definita la sequenza rappresentativa di ogni cluster. È stato scelto un sottogruppo di 5000 sequenze casuali da ciascun campione ed è stata stimata l'abbondanza di ogni OTU mappando le sequenze di ogni

campione contro la sequenza rappresentativa di ciascuna OTU utilizzando sempre la soglia del 97% di somiglianza per assegnare ogni sequenza ad una OTU. La classificazione tassonomica a diversi ranghi delle sequenze rappresentative è stata ottenuta mediante il classificatore bayesiano RDP (Cole et al., 2009).

È stata effettuata l'analisi statistica NMDS (Non-Metric multiDimensional Scaling) utilizzando la distanza di Hellinger e l'analisi post-hoc a livello di OTU (95% di confidenza) utilizzando il software STAMP (Parks et al., 2014). I test post-hoc sono stati eseguiti applicando la correzione di Benjamini-Hochberg (False Discovery Rate, FDR) per tenere conto di test statistici multipli (Benjamini e Hochberg, 1995).

2.5 PCR quantitativa (qPCR)

Per le curve di calibrazione degli standard di PCR è stato utilizzato il plasmide pCR2.1 (Life Technologies Italia, Monza, Italia) contenente un frammento del gene 16S rRNA. Il frammento ha la lunghezza di 466 bp (dalla base 331 alla 797 secondo la numerazione di *E. coli*) ed è stato ottenuto mediante PCR utilizzando la coppia di primer universali 331Forward (5'TCCTACGG-GAGGCAGCAGT-3') e 797Reverse (5'GGACTAC-

CAGGGTATCTAATCCTGTT-3') (Nadkarni et al. 2002). La concentrazione di DNA plasmidico è stata misurata con uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Diluizioni seriali del DNA plasmidico sono state usate come standard per qPCR. Ciascuna reazione di qPCR è stata condotta in un volume totale di 10 microlitri utilizzando la miscela di reazione FluoCycleII Sybr (Euroclone, Pero, Italia) con concentrazione finale di primer pari a 0,3 micromolare. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando il termociclatore per Real-Time PCR EcoSystem (Illumina, CA, USA). Il programma di amplificazione usato è il seguente: 95 °C per 4 min e successivamente 40 cicli composti da: 95 °C per 15 s, 60 °C per 30 s e 72 °C per 30 s, con l'acquisizione della fluorescenza sul canale FAM alla fine di ogni fase di allungamento a 72 °C. I controlli, gli standard e i campioni sono stati inclusi in triplice copia in ogni reazione.

2.6 Stima dell'abbondanza dei principali indicatori fecali

Le specie *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e il genere *Enterococcus* sono stati utilizzati come indicatori fecali. La loro abbondanza assoluta è stata stimata come prodotto tra il valore di abbondanza dei batteri totali ottenuto tramite qPCR e la frazione del taxon indicatore all'interno di ogni campione. Tale frazione è stata ottenuta mappando al 99% di similarità le sequenze di ogni campione contro le sequenze dei ceppi *Type Strain* di ciascun indicatore ottenuti dal database RDP (Cole et al., 2009).

3. RISULTATI

3.1 Variabilità della struttura delle comunità batteriche aeodisperse durante il processo di biorisanamento

Per evitare differenze di *coverage* tra i campioni, 5000 sequenze sono state casualmente selezionate da ciascun campione (Caporaso et al., 2012). Sono state identificate 17.694 OTU diverse, 5943 tra queste sono state scartate dalle analisi successive in quanto non sono risultate classificate nemmeno a livello di *Phylum*. Il numero di OTU per ciascun campione varia da 1176 a 7600 con un valore medio di 4489.

La classificazione tassonomica dei batteri presenti nell'aria a livello di ordine ha mostrato una struttura omogenea quando i campioni sono stati prelevati nel corso delle fasi di processo dell'impianto (asciugatura,

vagliatura o rivoltamento delle biopile), e non paiono mostrare differenze tra le diverse fasi di processo considerate. In generale, le comunità batteriche sono caratterizzate dalla presenza di *Actinomycetales*, *Bacillales*, e *Pseudomonadales*. La differenza più evidente nel confronto tra le diverse fasi è la maggiore abbondanza di *Hydrogenophylales* (9,3%) nelle comunità campionate durante il rivoltamento delle biopile.

Al contrario, i campioni raccolti ad impianto fermo sono risultati essere i più diversi. Infatti, le strutture della comunità osservate ad impianto fermo presentano una discreta abbondanza di *Bacillales* (13,5%), *Clostridiales* (17,7%), *Lactobacillales* (13,5%) e *Rhodobacterales* (16,3%) (Fig. 1). Questa differenza nelle comunità batteriche presenti nell'aria tra le condizioni di impianto attivo (indipendentemente dal processo in atto) e impianto fermo è stata evidenziata anche dall'analisi NMDS, in cui il poligono corrispondente ai campioni ad impianto fermo sono separati da tutti gli altri, mentre i poligoni indicanti comunità campionate durante le diverse fasi di processo sono più strettamente raggruppati e in parte sovrapposti (Fig. 2, in particolare i punti in verde).

Per valutare le differenze nel bioaerosol prodotto durante ogni fase di processo dell'impianto, i campioni relativi a ciascuna di esse sono stati singolarmente confrontati con i campioni raccolti ad impianto fermo utilizzando il Welch test a coppie del software STAMP con la correzione FDR di Benjamini-Hochberg. Il confronto tra assenza di attività e asciugatura ha rivelato differenze significative nell'abbondanza di 31 generi, quello tra assenza di attività e vagliatura differenze nell'abbondanza di 60 generi, mentre quello tra assenza di attività e rivoltamento delle biopile differenze nell'abbondanza di un solo genere (dati non mostrati). I 10 generi più abbondanti tra quelli che hanno mostrato differenze significative in ciascun confronto a coppie sono mostrati in Figura 3. In particolare, l'abbondanza del genere *Favobacterium* è risultata significativamente più abbondante durante l'asciugatura e la vagliatura che in l'assenza di attività (Fig. 3A, 3B). Mentre l'abbondanza del genere *Stenotrophomonas* è risultata significativamente maggiore in assenza di attività che in ciascuna delle fasi di processo considerate, incluso il rivoltamento delle biopile (Fig. 3C).

3.2 Influenza della sorgente di emissione sulla struttura delle comunità microbiche

Al fine di valutare la potenziale influenza dei sedimenti come fonte di batteri sulla struttura delle comunità microbiche dell'aria, sono stati raccolti e analizzati campioni di aria e di sedimenti relativi allo stesso lotto di materiale trattato. Sono stati confrontati sedimenti e aria corrispon-

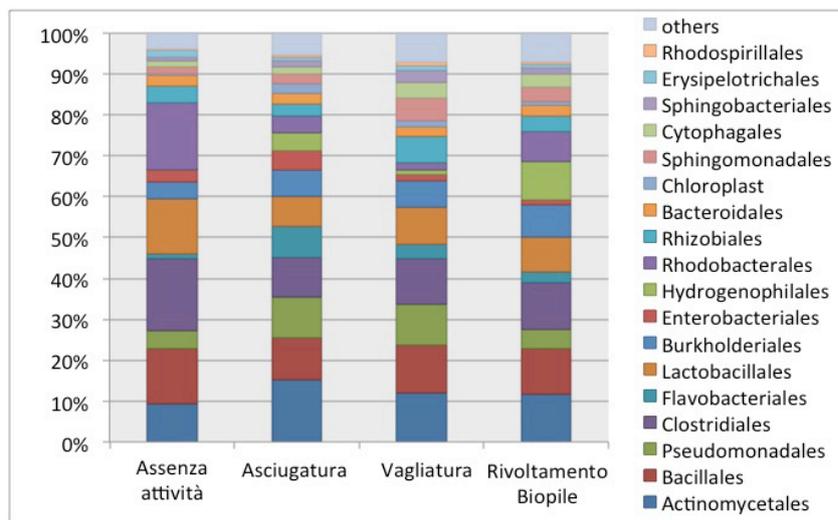


Figura 1 – Affiliazione tassonomica a livello di ordine.

denti agli stessi giorni di campionamento e alla stessa fase di processo (si vedano in Tabella 1, i campioni con gli asterischi). È stata effettuata un'analisi NMDS per confrontare le comunità batteriche di aria e sedimenti. Il grafico, riportato in Figura 4A, mostra chiaramente una separazione tra le comunità dell'aria e dei sedimenti. Inoltre, i punti che rappresentano le comunità batteriche in assenza di attività si collocano lontano dai punti relativi ai sedimenti, lungo il primo asse (cioè lungo l'asse che spiega la quota maggiore di variabilità), indicando quindi una minore diversità tra le comunità di sedimento e aria in presenza di attività. (Fig. 4A). L'analisi NMDS sui campioni di aria e sedimento nelle diverse attività ha rivelato una differenza tra le comunità associate alle diverse fasi. Dalla disposizione dei punti nel piano emerge

che le comunità di aria e suolo in corrispondenza della stessa fase sono diverse, ma se confrontate lungo l'asse verticale si può notare una certa vicinanza delle comunità di aria e sedimento in corrispondenza della stessa fase di processo (Fig. 4B).

Il Welch test ha indicato che vi sono 71 generi la cui abbondanza differisce significativamente tra le comunità di sedimenti e aria (dati non mostrati). I 10 generi più abbondanti tra questi sono mostrati in Figura 5. In particolare, i generi *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Clostridium XI* sono significativamente più abbondanti nell'aria, mentre *Steroidobacter* e *Ohtaekwangia* sono più abbondanti nei sedimenti. Invece, il confronto nelle singole fasi non ha restituito alcun genere significativo.

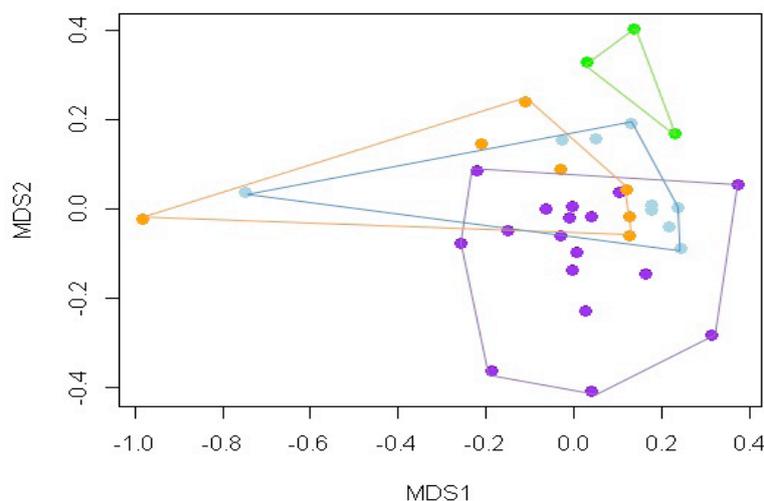


Figura 2 – Analisi NMDS (Non-metric MultiDimensional Scaling) delle comunità batteriche associate all'aria nelle diverse fasi del processo. In verde i campioni raccolti ad impianto fermo, in azzurro quelli raccolti durante l'asciugatura, in viola durante la vagliatura e in arancione durante il rivoltamento delle biopile. Stress: 0,168.

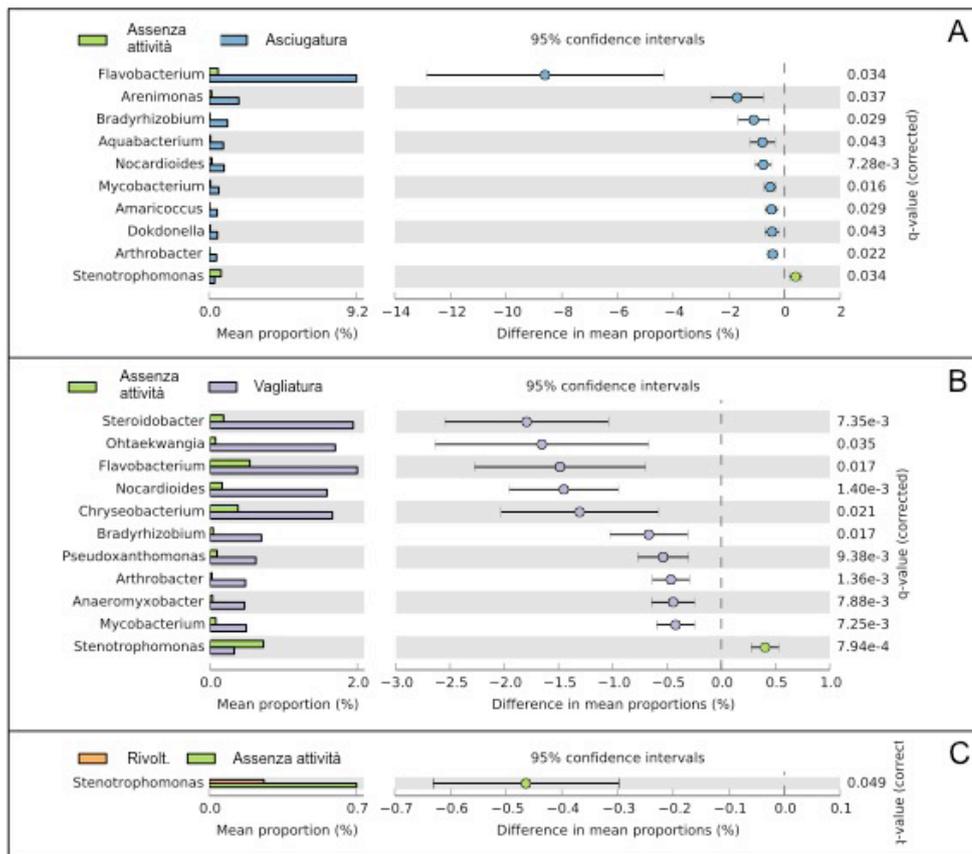


Figura 3 – I 10 generi più abbondanti tra quelli la cui abbondanza varia significativamente tra le comunità batteriche dell'aria osservate durante le diverse fasi di processo dell'impianto e in assenza di ogni attività (test di Welch). A: confronto tra assenza di attività e asciugatura. B: confronto tra assenza di attività e vagliatura. C: confronto tra assenza di attività e rivoltamento delle biopile.

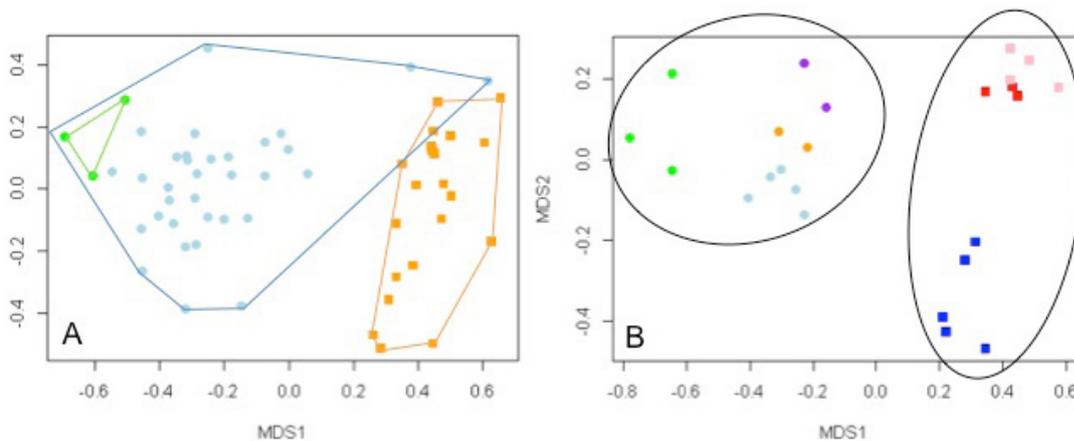


Figura 4 – Analisi NMDS delle comunità batteriche associate ad (A) aria (cerchi azzurri) e sedimenti (quadrati arancioni); in verde sono evidenziati i campioni relativi all'aria in assenza di attività. Stress: 0,119. (B) Comunità batteriche associate ad aria (cerchi) e sedimenti (quadrati) nel corso delle diverse fasi di attività dell'impianto. Campioni di aria (cerchi): verde = assenza di attività, azzurro = asciugatura; viola = vagliatura; arancio = rivoltamento. Campioni di sedimento (quadrati): blu = asciugatura; rosa = vagliatura; rosso = rivoltamento. Stress: 0,067.

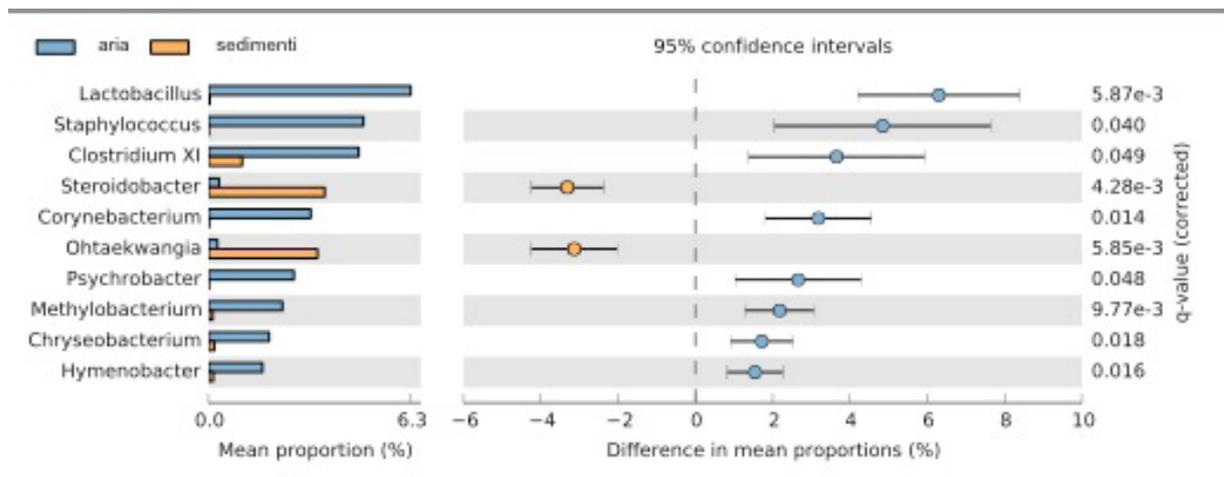


Figura 5 – I 10 generi più abbondanti tra quelli la cui abbondanza varia significativamente tra le comunità batteriche dell'aria e dei sedimenti in base ad un test di Welch.

3.3 Abbondanza di batteri totali e dei principali indicatori fecali

La quantificazione dei batteri presenti in atmosfera nelle diverse fasi di processo e ad impianto fermo è stata effettuata mediante qPCR. La misura dell'abbondanza è stata espressa come numero di copie di operoni ribosomiali per m³ d'aria. Questa unità di misura, pur non esprimendo il numero esatto di microorganismi presenti in un campione, è una stima attendibile dell'abbondanza dei batteri ed è comunemente usata in questo campo (Gandolfi et al., 2015). I dati di abbondanza sono riportati in Figura 6. L'abbondanza relativa dei batteri totali è risultata omogenea nelle diverse fasi considerate, mentre è più bassa per i campioni raccolti ad impianto fermo. Il valore medio per l'asciugatura è di $7,04 \times 10^5$ operoni ribosomiali per m³, per la vagliatura di $2,07 \times 10^6$ e per il rivoltamento delle biopile di $7,31 \times 10^5$. I campioni raccolti ad impianto fermo invece hanno un'abbondanza relativa media di circa 2 ordini di grandezza più bassa ($6,73 \times 10^4$) (Fig. 6A). La differenza di abbondanza tra le fasi di processo e l'assenza di attività è risultata statisticamente significativa per tutte le coppie saggiate (Tabella 2).

Inoltre, sono stati considerati i principali indicatori fecali. *Escherichia coli* ed *Enterococcus sp.* sono indicatori di contaminazione monitorati per legge (Dlgs 31/2001) in Italia nelle acque destinate al consumo umano (Briancesco, 2005). La specie *Clostridium perfringens* è stata analizzata per il forte impatto che può avere sulla salute umana (Payment e Franco 1993), nonostante il monitoraggio di questa specie non sia obbligatorio per legge. I boxplot 6B, C e D riportano la stima dell'abbondanza assoluta dei taxa indicatori fecali. Per tutti e tre i taxa considerati si nota una grande differenza di abbondanza tra campioni raccolti durante le fasi di processo ed in assenza di attività. Gli indicatori in assenza di attività sono meno abbondanti, mentre nelle diverse fasi considerate hanno un'abbondanza maggiore e molto simile. Le analisi indicano differenze statisticamente significative in tutti i confronti eseguiti (cfr. Tabella 2), ad eccezione di quello sull'abbondanza di *E. coli* tra assenza di attività e rivoltamento ($P = 0,06$).

Tabella 2 – Confronto tra le abbondanze di batteri totali e di batteri indicatori fecali osservati nell'aria ad impianto fermo e durante le diverse fasi di processo. I valori di significatività sono stati corretti per test statistici multipli.

Confronto	Batteri totali	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
No att. vs Asciugatura	0,00063	0,0032	0,016	0,004
No att vs Vagliatura	0,00091	0,0170	0,008	0,003
No att. Vs Rivoltamento	0,00119	0,0600	0,020	0,020

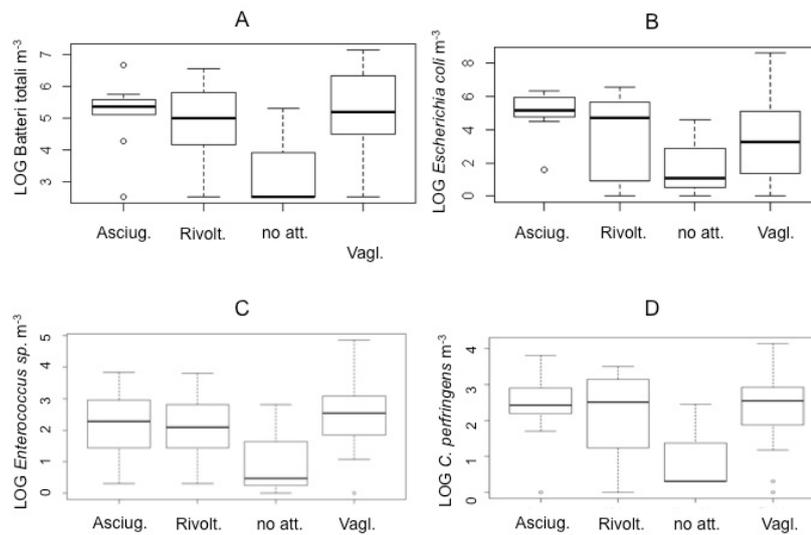


Figura 6 – (A) Boxplot dell’abbondanza dei microrganismi totali. (B) Boxplot dell’abbondanza di *Escherichia coli*. (C) Boxplot dell’abbondanza di *Enterococcus sp.* (D) Boxplot dell’abbondanza di *Clostridium perfringens*.

4. DISCUSSIONE

L’impianto considerato esegue il biorisanamento di matrici solide mediante biopile dinamiche. L’azienda effettua la pulizia di canali e rogge e tratta biologicamente i sedimenti raccolti affinché possano essere smaltiti senza rischi o riutilizzati nell’industria. Il sedimento trattato è di origine prettamente antropica ed è affetto da contaminazione di tipo fecale oltre che di tipo chimico (contaminazione da idrocarburi). La natura del materiale trattato rende l’impianto particolare nel suo genere e non esistono articoli di letteratura sul bioaerosol prodotto da questo tipo di processo. Per questo motivo la discussione dei dati sarà basata sul confronto con studi sul bioaerosol in attività di compostaggio (matrici solide) e in impianti di trattamento delle acque reflue (contaminazione fecale).

4.1. Variabilità della struttura delle comunità batteriche aeodisperse durante il processo di biorisanamento

Il primo scopo del lavoro è stato quello di verificare se le diverse fasi del processo di biotattamento influenzassero in maniera significativa la struttura delle comunità microbiche dell’atmosfera. Dal punto di vista tassonomico, la composizione delle comunità batteriche rivela una discreta omogeneità tra le diverse fasi di processo (Fig. 1). I taxa maggiormente abbondanti sono Gram positivi e sono abbondanti nell’aria campionata nel corso di tutte e tre le fasi considerate (cfr *Actinomycetales*, *Bacillales* e *Clostridiales*) e la loro presenza in atmosfera è stata già

ampiamente documentata sia in ambienti non direttamente associati a sorgenti puntuali (urbani, rurali, estremi) sia in corrispondenza di attività antropiche specifiche (Bowers et al., 2012; Bowers et al., 2011; Gandolfi et al., 2015; Grisoli et al., 2009). In particolare, microrganismi appartenenti a questi taxa sono stati osservati in molti impianti di compostaggio (Le Goff et al., 2010; Pankhurst et al., 2012). Da un confronto più dettagliato delle fasi di processo si nota una diminuzione di *Pseudomonadales* nella fase di rivoltamento delle biopile (dal 9,9% in asciugatura e vagliatura al 4,6% in rivoltamento), ossia nella fase in cui avviene l’effettivo processo di biorisanamento. Il genere *Pseudomonas* è considerato un indicatore di rischio in quanto ad esso appartengono specie patogene come l’opportunist *Pseudomonas aeruginosa* (Liang et al., 2015). Un’effettiva diminuzione dell’abbondanza di tale ordine potrebbe essere indice dell’efficacia del trattamento di biorisanamento. L’altra differenza rilevante è l’aumento dell’abbondanza relativa di *Hydrogenophilales* nei campioni d’aria raccolti durante il rivoltamento. A quest’ordine appartengono batteri termofili, come quelli dei generi *Hydrogenophilus* e *Thiobacillus* che sono in grado di ossidare rispettivamente idrogeno e zolfo. Per esempio, *Thiobacillus* prolifera nei fanghi, in paludi, acque reflue, salmastre e di drenaggio acido, ricava energia dall’ossidazione di composti dello zolfo, come zolfo elementare, solfuri e tiosolfato, convertendo questi composti tossici in solfati non tossici, che possono essere utili ad altri organismi. I Thiobacilli sono ampiamente utilizzati dall’uomo in

campo minerario e per il biorisanamento (Saier 2007; Dopson e Holmes, 2014). La presenza di specie termofile in impianti di compostaggio è stata ampiamente documentata (Bru-Adan et al., 2009). Tuttavia, la presenza nell'atmosfera presso impianti di questo tipo di questi due generi specifici non era mai stata documentata prima d'ora. L'aumento della loro abbondanza proprio nella fase di biorisanamento potrebbe essere dovuto al fatto che essi cooperino al processo trovando condizioni favorevoli alla loro proliferazione e che quindi possano essere risospesi nell'atmosfera circostante. L'analisi della composizione chimica del materiale trattato potrebbe consentire di verificare questa ipotesi.

Confrontando invece le strutture di comunità in condizioni di impianto attivo e non (e considerando tutte e tre le fasi di processo insieme), emergono differenze leggermente più marcate. Nelle comunità batteriche relative all'impianto fermo spiccano per abbondanza tre ordini: *Clostridiales*, *Lactobacillales* e *Rhodobacterales*. Al primo ordine appartiene il genere *Clostridium* che contiene al suo interno molte specie patogene, tra cui *Clostridium botulinum*, *difficile*, *perfringens* e *tetani*. La presenza di questo genere come fonte di contaminazione in impianti di trattamento di rifiuti (solidi o liquidi) è stata investigata in letteratura con risultati diversi. Per esempio Fracchia et al. (2006) hanno registrato tracce di contaminazione in due impianti di compostaggio in Piemonte, mentre, Grisoli et al. (2009), analizzando un impianto di compostaggio e uno di trattamento di acque reflue, limitrofi, in Nord-Italia, non hanno trovato alcuna contaminazione da *Clostridium*.

Se si considera invece il confronto a coppie tra impianto non attivo e, rispettivamente asciugatura, vagliatura e rivoltamento, emergono differenze significative nell'abbondanza di molteplici generi. In primo luogo, *Stenotrophomonas* è risultato l'unico genere significativamente più abbondante nei campioni relativi all'impianto fermo in tutti i confronti eseguiti. Tuttavia, questo genere appartiene ad un ordine identificato tassonomicamente come raro (<1%) nei campioni analizzati (Fig. 1), per cui le differenze trovate sono difficilmente interpretabili da un punto di vista ecologico.

Per quanto riguarda asciugatura e vagliatura sono state trovate differenze significative nell'abbondanza di vari generi comuni: *Nocardioidei*, *Mycobacterium* e *Arthrobacter* che appartengono all'ordine degli *Actinomycetales* e *Bradirhizobium* che appartiene all'ordine dei *Rhizobiales*. Un altro ordine comune trovato è quello dei *Flavobacteriales*, tuttavia il genere identificato come significativo si differenzia nelle fasi di processo: in asciugatura si trovano *Flavobacterium* mentre in vagliatura *Chriseobacterium*. A questi ordini appartengono microrganismi tipici del suolo e della rizosfera e sono stati indicati come particolarmente abbondanti in atmosfera in molteplici studi (Gandolfi et al., 2013; Polymenakou,

2012). In particolare, il genere *Mycobacterium* è stato ritrovato in corrispondenza di impianti di depurazione (Guo et al., 2015; Korzeniewska, 2011), mentre *Arthrobacter* e *Flavobacterium* sono stati trovati in aerosol da impianti di compostaggio con un'abbondanza relativa uguale o superiore all'1% (Wéry, 2014 e riferimenti al suo interno).

4.2 *Influenza della sorgente di emissione sulla struttura delle comunità microbiche*

La seconda ipotesi che è stata verificata nel presente lavoro è l'influenza della sorgente sulla struttura delle comunità microbiche dell'aria. La matrice trattata nell'impianto è stata considerata come sorgente di batteri in quanto le operazioni condotte sui sedimenti durante il trattamento favoriscono l'aerodispersione di polveri. I risultati emersi dall'analisi NMDS hanno permesso di identificare una maggiore somiglianza tra le comunità batteriche dell'aria e quelle del sedimento durante delle fasi attive del trattamento che ad impianto fermo (Fig. 4A). I campioni di aria prelevati in assenza di qualunque tipo di operazione nell'impianto, infatti, si collocano lontano da quelli del sedimento del grafico NMDS, indicando quindi una maggiore diversità. Questi dati lasciano supporre che le fasi di asciugatura, vagliatura e rivoltamento favoriscano la risospensione di batteri in atmosfera. Questa maggiore tendenza all'aerodispersione in corrispondenza delle fasi operative dell'impianto potrebbe spiegare la maggiore somiglianza delle comunità dell'aria a quelle della matrice e questo dato sembra confermare l'influenza della sorgente sulla composizione delle comunità microbiche dell'aria. Il confronto tra le comunità dell'aria raccolte in ciascuna fase e quelle di sedimento ha evidenziato tra gli altri come significativamente più abbondanti nell'aria i generi *Staphylococcus*, *Clostridium XI* e *Corynebacterium*. La loro presenza è stata già individuata in impianti di compostaggio mediante tecniche molecolari o di coltivazione (Le Goff et al., 2010; Wéry 2014; Guo et al., 2015).

4.3 *Abbondanza di batteri totali e dei principali indicatori fecali*

Il numero totale di batteri aerodispersi trovato in questo impianto (ordine di grandezza medio: 10^6 operoni ribosomiali per m^3) è abbastanza elevato se paragonato a quello comunemente trovato in un ambiente non direttamente condizionato da una fonte puntuale di batteri aerodispersi. Per esempio, in ambiente urbano sono stati trovati mediante lo stesso metodo di quantificazione circa 10^4 operoni ribosomiali per m^3 (Gandolfi et al., 2015; Bertolini et al., 2013). Invece, per quanto riguarda la concen-

trazione di batteri in corrispondenza di precise sorgenti puntuali si può dire che in letteratura sono stati trovati risultati diversi soprattutto a causa dei differenti metodi di quantificazione utilizzati e delle diverse popolazioni batteriche analizzate. Per esempio, uno studio comparato su quattro diverse fonti di emissione (compost, fanghi, ambiente agricolo e bestiame) in Finlandia rileva un'alta concentrazione di batteri Gram +/- (ottenuta mediante qPCR) in ambiente agricolo (10^2 - 10^6 cellule per m^3) e una concentrazione lievemente minore nei pressi di un centro di trattamento rifiuti (10^2 - 10^4 cellule per m^3) (Kaarakainen et al. 2011). In questo caso quindi l'abbondanza rilevata in questo studio è dello stesso ordine di grandezza di quella trovata da Kaarakainen et al. (2011). Analizzando invece le variazioni di abbondanza durante le fasi di biorisanamento nell'impianto in questione, la quantificazione di batteri totali indica una differenza significativa tra le comunità batteriche in assenza e in presenza di attività. Dal punto di vista quantitativo si può osservare una netta inferiorità del numero totale di batteri nel bioaerosol in assenza di attività (diminuzione di circa 2 ordini di grandezza, da 10^6 a 10^4 operoni ribosomiali per m^3). Questa differenza suggerisce che siano le operazioni condotte nell'impianto a facilitare l'aerodispersione dei batteri in atmosfera. Si può infatti facilmente ipotizzare che l'asciugatura favorisca l'evaporazione delle molecole d'acqua presenti nei sedimenti e quindi la formazione di aerosol. La vagliatura e il rivoltamento delle biopile creano una sospensione di polveri contestualmente alle quali potrebbero essere dispersi i batteri. I dati raccolti suggeriscono che, a livello quantitativo, i batteri possano essere trasportati a corto raggio in atmosfera dalla sorgente di emissione (il sedimento). In letteratura questa ipotesi è stata valutata finora solo dal punto di vista qualitativo, osservando le variazioni dell'abbondanza relativa di popolazioni batteriche specifiche, ad esempio l'abbondanza di batteri sporigeni, nel bioaerosol raccolto a diverse distanze dalla fonte (Le Goff et al., 2010; Sanchez-Monedero et al., 2005). Per quanto riguarda gli indicatori fecali considerati, i risultati ottenuti mostrano che la frazione di *E. coli*, *Enterococcus sp.* e *C. perfringens* non varia in corrispondenza di una fase specifica del processo, mentre diminuisce fino a due ordini di grandezza in condizioni di assenza di attività. Le comunità batteriche totali e la frazione di indicatori fecali variano nello stesso modo durante le fasi del biorisanamento. La dispersione di batteri patogeni sembrerebbe non essere maggiormente favorita in una fase particolare, bensì pare che tutte le fasi di processo favoriscano la dispersione di batteri (patogeni e non) in misura simile. Per questo motivo, sulla base di questi risultati si può supporre che i microorganismi patogeni non abbiano una maggiore facilità di dispersione rispetto alla comunità totale. Quindi, nell'ottica di prevenire il rischio di aerodispersione di batteri pericolosi per la

salute dell'uomo sarebbe necessario intervenire sulla comunità batterica totale piuttosto che sui singoli taxa indicatori.

5. CONCLUSIONE

In conclusione, in questo studio sono state analizzate la struttura e l'abbondanza delle comunità batteriche aerodisperse associate ad una fonte puntuale di bioaerosol. Le differenze più marcate sia dal punto di vista qualitativo sia quantitativo sono state evidenziate dal confronto tra campioni in assenza e in presenza di attività nell'impianto. Sembra che le diverse fasi del processo di biorisanamento influenzino la composizione e l'abbondanza delle comunità batteriche. In particolare, si può ipotizzare che le fasi di asciugatura, vagliatura e di rivoltamento delle biopile favoriscano l'evaporazione di goccioline d'acqua e la risospensione di polveri e in questo modo il trasferimento di batteri dalla sorgente all'atmosfera.

La presenza dei principali indicatori fecali è stata valutata e si è notata una relazione tra la variazione degli indicatori e quella dell'intera comunità batterica. Secondo i dati raccolti, sembrerebbe che il problema del rischio di dispersione di batteri in atmosfera debba essere affrontato a livello delle comunità batteriche totali più che di singole popolazioni.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Benjamini Y. e Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*, 57(1), pp.289–300.
- Bertolini V., Gandolfi I., Ambrosini R. et al. (2013) Temporal variability and effect of environmental variables on airborne bacterial communities in an urban area of Northern Italy. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(14), pp.6561–70.
- Bowers R.M., Lauber C.L., Wiedinmyer C. et al. (2009) Characterization of airborne microbial communities at a high-elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), pp.5121–30.
- Bowers R.M., McLetchie S., Knight R. al. (2011) Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *The ISME journal*, 5(4), pp.601–12.
- Bowers R.M., McCubbin I.B., Hallar A.G. et al. (2012) Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmospheric Environment*, 50, pp.41–49.
- Brandl H., Bachofen R. e Bischoff M. (2005) Generation

- of bioaerosols during manual mail unpacking and sorting. *Journal of applied microbiology*, 99(5), pp.1099–107.
- Briancesco R. (2005). Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque superficiali. *Ann Ist Super Sanità*, 41(3), pp.353–358.
- Bru-Adan V., Wéry N., Moletta-Denat M., et al. (2009) Diversity of bacteria and fungi in aerosols during screening in a green waste composting plant. *Current microbiology*, 59(3), pp.326–35.
- Camatini M., Corvaja V., Pezzolato E., et al. (2012) PM10-biogenic fraction drives the seasonal variation of proinflammatory response in A549 cells. *Environmental toxicology*, 27(2), pp.63–73.
- Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., et al. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6(8), pp.1621–1624.
- Claesson M.J. Wang Q., O’Sullivan O. et al. (2010) Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic acids research*, 38(22), p.e200.
- Cole J.R. Wang Q., Cardenas E., et al. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), pp.D141–5.
- Domingo J.L. e Nadal M. (2009) Domestic waste composting facilities: a review of human health risks. *Environment international*, 35(2), pp.382–9.
- Dopson M. e Holmes D.S. (2014) Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(19), pp.8133–44.
- Dungan R.S. (2010) Board-Invited Review: fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *Journal of animal science*, 88(11), pp.3693–706.
- Edgar R.C. (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10(10), pp.996–998.
- Fischer G., Müller T., Ostrowski R. et al. (1999) Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities. *Chemosphere*, 38(8), pp.1745–1755.
- Fracchia L., Pietronave S., Rinaldi M. et al. (2006) The assessment of airborne bacterial contamination in three composting plants revealed site-related biological hazard and seasonal variations. *Journal of applied microbiology*. 100 (5), pp. 973-84.
- Gandolfi I. Bertolini V., Ambrosini R. et al. (2013) Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(11), pp.4727–36.
- Gandolfi I., Bertolini V., Ambrosini R. et al. (2015) Spatio-temporal variability of airborne bacterial communities and their correlation with particulate matter chemical composition across two urban areas. *Applied microbiology and biotechnology*. [Accessed March 4, 2015].
- Golubić S., Pietrini A.M. e Ricci S. (2015) Euendolithic activity of the cyanobacterium *Chroococcus lithophilus* Erc. In biodeterioration of the Pyramid of Caius Cestius, Rome, Italy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 100, pp.7–16.
- Grisoli P. Rodolfi M., Villani S. et al. (2009) Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. *Environmental research*, 109(2), pp.135–42.
- Guo F. Wang Z., Yu K. et al. (2015) Detailed investigation of the microbial community in foaming activated sludge reveals novel foam formers. *Scientific reports*, 5, p.7637.
- Haas D. Unteregger M., Habib J. et al. (2009) Exposure to Bioaerosol from Sewage Systems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 207(1-4), pp.49–56.
- Huber J.A., Welch M., Morrison J.B. et al. (2007) Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*. 318, pp.97-100.
- Karakainen P., Rintala H., Meklin T. et al. (2011) Concentrations and Diversity of Microbes from Four Local Bioaerosol Emission Sources in Finland. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 61(12), pp.1382–1392.
- Korzeniewska E. (2011) Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - A review. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 3 S(2), pp.393–407.
- Le Goff O., Bru-Adan V., Bacheley H. et al. (2010) The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *Journal of applied microbiology*, 108(1), pp.325–40.
- Le Goff O., Godon J., Steyer J. et al. (2011) New specific indicators for qPCR monitoring of airborne microorganisms emitted by composting plants. *Atmospheric Environment*, 45(30), pp.5342–5350.
- Liang L. Goh S.G., Vergara G.G.R.V. et al. (2015) Alternative Fecal Indicators and Their Empirical Relationships with Enteric Viruses, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa* in Surface Waters of a Tropical Urban Catchment. *Applied and environmental microbiology*, 81(3), pp.850–60.
- Millner P.D., Bassett D.A. e Marsh P.B. (1980) Dispersal of *Aspergillus fumigatus* from sewage sludge compost piles subjected to mechanical agitation in open air. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(5), pp.1000–1009.
- Nadkarni M.A. Martin F.E., Jacques N.A. et al. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), pp.257–266.
- Pankhurst L.J., Whitby C., Pawlett M. et al. (2012) Temporal and spatial changes in the microbial bioaerosol communities in green-waste composting. *FEMS microbiology ecology*, 79(1), pp.229–39.
- Parks D.H. Tyson, G.W. Hugenholtz P., et al. (2014) Genome analysis STAMP: Statistical analysis of taxo-

- onomic and functional profiles. *Bioinformatic Advance*, pp.1–2.
- Payment P. e Franco E. (1993) Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of drinking water treatment for viruses and protozoans. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), pp.2418–2424.
- Polymenakou P.N. (2012) Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes? *Atmosphere*, 3(4), pp.87–102.
- Rinsoz T., Duquenne P., Greff-Mirguet G. et al. (2008). Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods. *Atmospheric Environment*, 42(28), pp.6767–6774.
- Saier M.H. (2007) Beneficial bacteria and bioremediation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184(1-4), pp.1–3.
- Sanchez-Monedero M., Stentiford E. e Urpilainen S. (2005) Bioaerosol generation at large-scale green waste composting plants. *Journal Of The Air & Waste Management Association*, 55(5), pp.612–618.
- Wang, Y. e Qian P. (2009) Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *Plos One*. 4, e7401.
- Wéry, N. (2014) Bioaerosols from composting facilities- a review. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4(April), p.42.
- Zweifel, U.L., Hagström, Å., Holmfeldt, K., et al. (2012) High bacterial 16S rRNA gene diversity above the atmospheric boundary layer. *Aerobiologia*, 28(4), pp.481–498.

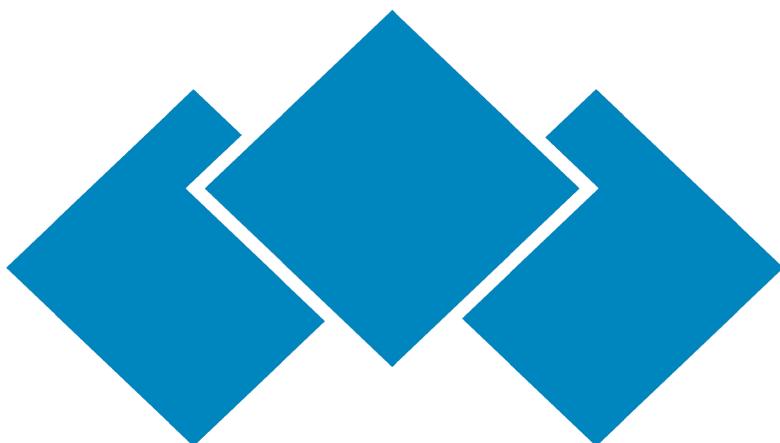
RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato parzialmente finanziato dal Ministero dell’Istruzione, dell’Università e della Ricerca (PRIN 2010 2011, grant 2010WLNIFY2_005). Si ringrazia inoltre la società Sistemi Ambientali srl per il supporto, in particolare Fabio Tomasoni per il campionamento.

Ingenieria dell' Ambiente per il 2015 è sostenuta da:



Veolia Water Technologies Italia S.p.A.



UNICALCE

Innoviamo la tradizione



comieco

Consorzio Nazionale Recupero e Riciclo
degli Imballaggi a base Cellulosica