



Agenzia Regionale per la Prevenzione  
e Protezione Ambientale del Veneto



REGIONE DEL VENETO

# **PRESENZA DI CLOSTRIDIUM BOTULINUM NEI PROCESSI DI DIGESTIONE ANAEROBICA**

**LUGLIO 2014**

**ARPAV**  
**Direttore Generale**  
*Carlo Emanuele Pepe*

**Direttore Tecnico**  
*Paolo Rocca*

**Direttore Dipartimento Provinciale di Treviso**  
*Loris Tomiato*

**Servizio Osservatorio Rifiuti – Osservatorio Regionale per il Compostaggio**  
*Lorena Franz*

**Servizio Osservatorio Suolo e Bonifiche**  
*Paolo Giandon*

**Progetto e realizzazione:**  
*Lorena Franz e Paolo Giandon (Responsabili delle strutture)*  
*Alberto Ceron (Campionamento, elaborazione dati e testi)*

**Unità Operativa Microbiologia e Biologia Ambientale ARPAV**  
*Franco Rigoli (revisione dei testi)*

## INDICE

<b><u>1. Il processo di digestione anaerobica</u></b> .....	4
<b><u>2. Microrganismi coinvolti nel processo</u></b> .....	8
<b><u>2.1 I microrganismi indesiderati</u></b> .....	9
<b><u>2.2 Il genere Clostridium</u></b> .....	11
<b><u>2.2.1 La specie <i>C. botulinum</i></u></b> .....	12
<b><u>3. Controversie sulla presenza di Clostridi e <i>C. botulinum</i> negli impianti di biogas</u></b> .....	17
<b><u>4. Presenza di <i>C. botulinum</i> negli impianti di biogas del Veneto</u></b> .....	19
<b><u>5. Bibliografia</u></b> .....	23

## 1. Il processo di digestione anaerobica

La digestione anaerobica è il processo biologico mediante il quale, in assenza di ossigeno, la materia organica, proveniente indistintamente da biomasse vegetali e/o animali, viene degradata da parte di microrganismi, dando luogo così alla produzione di:

- biogas, una miscela costituita principalmente da metano (dal 50 al 70%) e anidride carbonica, con tracce di altri gas quali ad esempio idrogeno solforato, ammoniacale, ammine e vapore acqueo.
- digestato, dotato di valore fertilizzante che, nei casi consentiti dalla normativa, può trovare collocazione agronomica con un riciclo virtuoso degli elementi fertilizzanti di origine organica. In tutti gli altri casi, rappresentando un rifiuto dal punto di vista normativo, come tale deve essere gestito. Il digestato prima del suo stoccaggio e in attesa del suo utilizzo o trasporto solitamente viene sottoposto ad una o più separazioni solido/liquido.

Nello specifico il processo di digestione anaerobica consiste in diverse reazioni, catalizzate da differenti gruppi batterici, nelle quali i composti passano attraverso differenti stati di ossidazione fino ad essere convertiti in metano ed anidride carbonica. Si possono distinguere le seguenti fasi (schematizzate in fig. 1):

- Prima fase: Idrolisi

L'idrolisi prevede la degradazione dei substrati organici complessi, quali lipidi, proteine e carboidrati in composti più semplici, rispettivamente glicerolo e acidi grassi, amminoacidi e monosaccaridi.

- Seconda fase: Acidogenesi

L'acidogenesi è generalmente definita come produzione biologica anaerobica di acidi organici in assenza di accettori o donatori di elettroni (Gujer e Zehnder, 1983). I prodotti sono acidi grassi volatili a catena corta. Per acidi grassi volatili si intendono essenzialmente acido propionico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ) butirrico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) e valerico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ).

Dalla degradazione di carboidrati e proteine vengono prodotti, in diversi rapporti, sia acidi grassi che acido acetico, mentre la trasformazione degli acidi grassi a lunga catena porta solo alla produzione di acido acetico.

- Terza fase: Acetogenesi

In questa fase vi è l'attacco del substrato molecolare precedentemente formato, da parte dei batteri acetogeni che producono biossido di carbonio ( $\text{CO}_2$ ), idrogeno ( $\text{H}_2$ ) e principalmente

acido acetico ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). L'acetogenesi può essere considerata come l'ossidazione anaerobica di acidi grassi per formare acido acetico.

- Quarta fase: Metanogenesi

La produzione di  $\text{CH}_4$  rappresenta la conclusione della catena trofica anaerobica. Il metano infatti è l'unico composto non reattivo nell'intero processo di digestione anaerobica e può, pertanto, essere considerato il prodotto finale dell'intero processo.

La produzione del metano avviene principalmente attraverso due vie differenti:

- nella prima grazie ai batteri idrogenotrofi, che utilizzano la  $\text{CO}_2$  come accettore, avviene la seguente reazione:  $\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ;
- nella seconda l'acido acetico viene degradato a metano per via acetoclastica attraverso la reazione:  $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ .

E' con quest'ultima reazione che si ottiene la maggiore produzione di idrogeno, circa il 70% del  $\text{CH}_4$  proviene dal  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , in quanto la maggior parte della sostanza putrescibile si degrada ad acido acetico, mentre solo il restante 30% deriva dalla riduzione della  $\text{CO}_2$ .

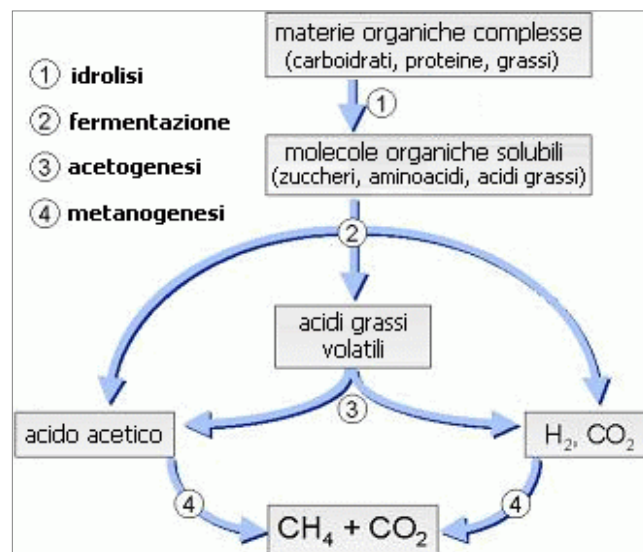


Fig. 1 - Schema riassuntivo di decomposizione anaerobica delle sostanze organiche durante la digestione.  
Fonte: <http://www.energia-ecologia.net/energia/vademecum/cat5.html>

Un'ulteriore classificazione si effettua a seconda delle tecniche di digestione anaerobica utilizzate; si distinguono così due tipologie di processi:

- digestione a umido (wet), quando il substrato in digestione ha un contenuto di sostanza secca inferiore al 10%; è questa la tecnica più diffusa, in particolare con i liquami zootecnici;

- digestione a secco (dry), quando il substrato in digestione ha un contenuto di sostanza secca superiore al 20%.

Processi con valori intermedi di sostanza secca sono meno comuni e in genere definiti a semi-secco (semi-dry).

Infine, l'ultima classificazione identifica le fasi in cui può avvenire il processo di digestione anaerobica, suddivise in:

- processo monostadio, quando le fasi di idrolisi, fermentazione acida e metanigena avvengono contemporaneamente in un unico reattore;
- processo bistadio, quando si ha un primo stadio durante il quale il substrato organico viene idrolizzato e contemporaneamente avviene la fase acida, mentre la fase metanigena avviene in un secondo momento in un diverso reattore.

Il processo di digestione anaerobica, al fine di massimizzare la produzione di biogas e di metano in esso contenuto, deve avvenire in condizioni controllate al fine di ottimizzare l'evolversi di tutti i processi metabolici di cui sono responsabili le popolazioni microbiche. I parametri indicatori più comunemente monitorati nella gestione ordinaria degli impianti sono i seguenti:

- temperatura: ha un effetto determinante sulla rapidità e la completezza delle reazioni di degradazione anaerobica. Tutte le reazioni che avvengono all'interno del reattore sono molto sensibili alle variazioni di temperatura. Essa è in grado di selezionare le popolazioni batteriche all'interno del digestore, una vera e propria sostituzione di popolazioni batteriche che risultano presenti solo in alcuni ristretti intervalli di temperatura. Si distinguono tre range di temperatura:
  - campo psicrofilo: 4-15°C
  - campo mesofilo: 20-40°C con valore ottimale a 35°C
  - campo termofilo: 45-70°C con valore ottimale a 55°C

Una volta scelto il campo operativo le oscillazioni di temperatura vanno limitate a 2-3 °C in quanto possono influire sulle prestazioni generali del processo. Ne deriva la necessità di gestire con particolare accuratezza i sistemi di controllo per il funzionamento dei dispositivi di riscaldamento.

- pH: è uno dei parametri di maggior rilievo. Durante le fasi di acidogenesi e acetogenesi il pH ottimale è acido, dell'ordine di 5 – 5,5, mentre per consentire un'adeguata attività dei batteri metanigeni, che sono i più importanti e delicati per il processo, i valori di pH ottimali sono compresi tra 7 - 7,5. Al di sotto di tali valori l'attività metanigena risulta ridotta e

al di sotto di pH 6 gravemente compromessa. Bisogna quindi bloccare la produzione di acidi grassi in modo che il pH non scenda sotto a tali valori, operazione che viene fatta con il controllo dell'alcalinità.

All'effetto sul metabolismo si somma anche l'effetto dovuto allo spostamento degli equilibri degli acidi organici verso la forma non dissociata, a pH acidi. E' molto importante quindi alimentare il biodigestore con regolarità durante le 24 ore, in modo da mantenere il valore di pH ai valori desiderati. Cadute del valore di pH al di sotto di 7 indicano infatti accumulo di acidi grassi volatili, spesso dovuto a sovralimentazione del digestore e quindi un errato rapporto tra materiale già digerito (digestato) e materiale fresco (ancora da decomporre).

- Alcalinità (effetto tampone): l'alcalinità rappresenta la capacità di un sistema di neutralizzare protoni ed è generalmente espressa in termini di concentrazione di carbonato di calcio. Questa viene determinata, analiticamente, sulla fase liquida presente nel reattore, per titolazione con acido cloridrico. Valori di alcalinità dell'ordine di 3000-5000 mg CaCO<sub>3</sub> per litro sono tipici per i digestori anaerobici operanti in condizioni stabili (Stafford et al., 1980).
- Acidi grassi volatili: il livello di concentrazione degli acidi volatili, generalmente espresso in termini di acido acetico o di COD, dipende dal tipo di substrato trattato, e varia da circa 200 fino a 2000 mg/l. Di norma non è la concentrazione assoluta ad essere assunta come parametro di stabilità ma piuttosto la variazione di concentrazione: variazioni repentine con incremento della concentrazione indicano che la digestione sta scivolando verso processi acidogenici piuttosto che metanigenici (APAT, 2005). Il valore di concentrazione degli acidi grassi volatili non va disgiunto dal dato della produzione del biogas e dalla sua composizione, oltre che dai dati relativi a pH ed alcalinità (APAT, 2005).
- Rapporto acidi grassi volatili/alcalinità: la concentrazione degli acidi grassi volatili e l'alcalinità sono i due parametri che mostrano una più rapida variazione quando il sistema tende ad allontanarsi da condizioni di stabilità. Dal momento che, in caso di problemi, la concentrazione degli acidi grassi tende ad aumentare mentre l'alcalinità tende a diminuire, un utile parametro da considerare è il rapporto tra queste due grandezze. Gli acidi grassi, al numeratore, sono espressi in termini di acido acetico, mentre l'alcalinità viene espressa in termini di concentrazione del carbonato di calcio (APAT, 2005). Valori del rapporto intorno a 0.3 indicano una operatività stabile del digestore, mentre valori superiori possono indicare l'insorgere di problemi di stabilità. (APAT, 2005).

- Produzione e composizione del biogas: Il monitoraggio della quantità e della composizione (almeno in termini di metano e biossido di carbonio) del biogas è di fondamentale importanza per il controllo della stabilità del processo di digestione anaerobica (Stafford et al., 1980). Se il reattore sta operando in condizioni di stabilità la produzione e la composizione del biogas risultano costanti.
- Sostanze inibenti: oltre agli elementi già citati vi sono numerose altre sostanze che esercitano un'azione tossica sul processo e possono essere di tipo naturale o xenobiotico. Eventuali elementi inibenti sono i metalli pesanti, sali, azoto ammoniacale, residui di pesticidi e prodotti farmaceutici, antibiotici, detergenti e disinfettanti, solventi, inibitori da trattamenti chimici per la conservazione di cibi, ecc.

## 2. Microrganismi coinvolti nel processo

I microrganismi coinvolti nelle differenti fasi del processo di digestione anaerobica possono essere suddivisi nei seguenti gruppi:

- batteri idrolitici, i quali grazie alla produzione di enzimi extracellulari sono in grado di scindere le molecole organiche complesse in oligomeri e monomeri semplici;
- batteri acidogenici, sono in grado di ossidare i substrati organici semplici in acidi grassi volatili a catena corta per lo più a catena corta quali il propionato ed il butirrato;
- batteri acetogeni, producono biossido di carbonio ( $\text{CO}_2$ ), idrogeno ( $\text{H}_2$ ) e principalmente acido acetico ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ );
- batteri metanigeni, essi vengono distinti in due gruppi: a) Acetoclastici, che producono metano ed anidride carbonica partendo dall'acetato; b) Idrogenotrofi, che producono metano partendo da idrogeno ed anidride carbonica.

I batteri metanigeni sono tutti anaerobi stretti e fanno parte del dominio degli Archeobatteri (Archaea). Tra i principali generi ricordiamo Methanosarcina e Methanotrix, entrambi della famiglia delle Methanosarcinacee. Altri generi coinvolti sono Methanobacterium e Methanobrevibacter della famiglia dei Methanobacteriaceae, ed il Methanococcus appartenente alla famiglia delle Methanococcacee.

I due generi principali presentano velocità di crescita diverse: il genere Methanosarcina presenta velocità di crescita che sono circa quadruple di quelle del genere Methanotrix.

I Methanosarcina hanno un ciclo vitale complesso e non del tutto chiaro che consiste in fasi alterne di aggregazione e dispersione, con una scarsa suscettibilità ad aderire ai materiali.



Al contrario i batteri del genere *Methanotrix* hanno una forte tendenza ad aderire ai supporti e a raggrupparsi fra loro inglobando anche altri microrganismi (formazione di fiocchi e granuli batterici).

Oltre ai metanigeni moltissimi altri batteri partecipano alla digestione anaerobica nelle sue varie fasi; tra i principali generi batterici ci sono: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Ruminococcus*, *Bacterioides*, che fanno parte dei batteri idrolitici.

## 2.1 Microrganismi indesiderati

Una prima distinzione tra le varie specie batteriche consiste tra saprofiti, ovvero quegli organismi che si nutrono di materia organica morta o in decomposizione e parassiti, ossia quelli che si sviluppano a spese di un organismo "ospite", utilizzando le sostanze che esso produce e trasformandole in sostanze più semplici.

Fra i batteri saprofiti ve ne sono di autotrofi, cioè utilizzano prodotti chimici inorganici base presenti nell'acqua, trasformandoli in materiale cellulare complesso; e vi è la maggior parte costituita dagli eterotrofi, ovvero coloro che si nutrono di sostanze organiche preformate, trasformandole in sostanze più semplici e come stadio finale in sostanze inorganiche (Masotti, 1987).

Fra i batteri dannosi, assumono particolare importanza i patogeni, i quali, per definizione, danneggiano l'ospite colpito.

Il primo attributo che fa di un parassita un patogeno è la tossicità, ovvero la capacità di produrre sostanze tossiche, ma ciò non è sufficiente, occorre anche la virulenza, ovvero che esso sia in grado di penetrare nei tessuti dell'organismo ospite e di moltiplicarvisi (Rosa e La Placa, 1965).

Sulla base di questi due fattori un microrganismo si considera poco o molto patogeno se la carica minima infettante necessaria a determinare la malattia sia più o meno alta. Pertanto perché si realizzi la malattia è necessario che l'agente eziologico che aggredisce l'organismo sia in quantità numerica efficiente (Rosa e La Placa, 1965).

I batteri patogeni e i virus, in particolare il genere *Norovirus*, sono la principale causa di gastroenteriti nel mondo. Per quanto riguarda i batteri, uno studio americano indica che *Campylobacter*, seguito da *Salmonella* e da *Shigella* (quest'ultimo isolato solitamente in America e molto meno in Europa) siano le cause principali di gastroenteriti batteriche;

altre specie come *E. coli* O157:H7, *H. pylori* e *L. monocytogenes* sono causa di nuove preoccupazioni (Sidhu e Toze, 2009).

Molti patogeni sono difficili da individuare e quantificare, pertanto vengono usati dei “batteri indicatori” per monitorare il livello batterico presente nel campione da analizzare.

Un'altra caratteristica utilizzata per la distinzione di molti batteri è basata sugli effetti della colorazione di Gram. Tale colorazione viene effettuata in laboratorio grazie all'utilizzo di coloranti e permette di effettuare due distinzioni: Gram-positivi e Gram-negativi sulla base delle differenze strutturali della parete cellulare. L'utilizzo poi dell'etanolo permette di decolorare un batterio Gram-negativo, ma non un Gram-positivo (Madigan et al., 2006). Tra i Gram-positivi vi sono i generi sporigeni come *Bacillus* e *Clostridium*.

Durante il processo definito di sporulazione, tali batteri sono in grado di produrre speciali strutture chiamate endospore. Esse sono “cellule differenziate molto resistenti al calore e che non possono essere distrutte facilmente, nemmeno dai detergenti chimici” (Madigan et al., 2006).

Proprio per la loro struttura (Fig. 2), costituita da numerosi strati di rivestimento, le endospore sono resistenti all'essiccamento, alle radiazioni ultraviolette, al calore e ai comuni disinfettanti.

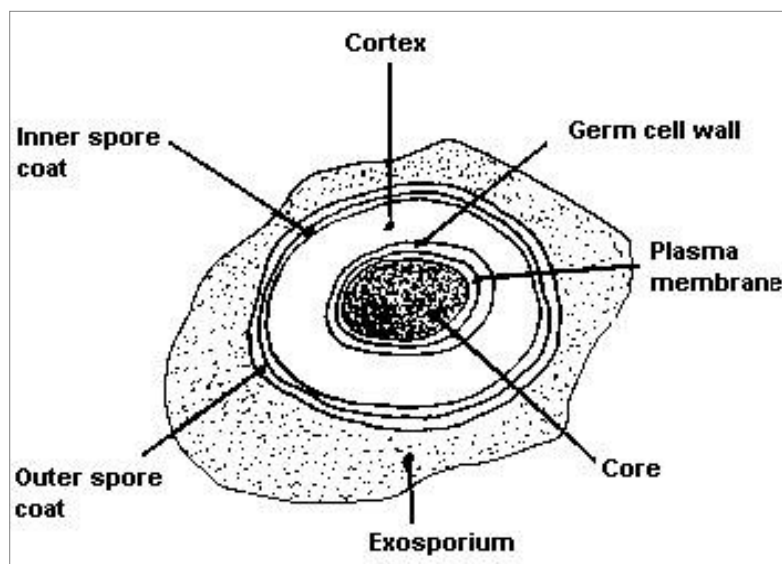


Fig. 2 – Struttura di una endospora. Tratta dal sito: <http://agentsmithwill.net84.net/Forras/tobbsejt.html>

I batteri sporigeni crescono come batteri vegetativi in condizioni favorevoli, ma quando le condizioni di crescita sono povere essi possono sopravvivere come spore per lunghi periodi di tempo, resistendo a condizioni anche estreme di temperatura, pH, esposizione a raggi UV ed a sostanze chimiche tossiche.

Un'endospora è in grado di rimanere in condizioni di vita latente per molti anni, ma non appena compaiono le condizioni favorevoli avviene la germinazione, ovvero passa dallo stato sporale alla forma vegetativa. Durante questo passaggio, che si verifica attraverso tre fasi, di seguito elencate, si ha la ripresa di tutte le funzioni del microrganismo, comprese la replicazione e l'espressione di tutti i fattori di patogenicità:

- I stadio Attivazione: avviene in condizioni ambientali ottimali; sono necessari un certo range di temperatura, la presenza di acqua, ma soprattutto la presenza di nutrienti specifici.
- II stadio Germinazione: è un processo rapido, dura in genere pochi minuti, ed è caratterizzato da una serie di reazioni che degradano la corteccia, grazie all'ingresso di metaboliti che attivano gli enzimi litici.
- III stadio Esocrescita: comporta un visibile rigonfiamento, in seguito all'assunzione di acqua e ioni per la reidratazione cellulare. In seguito in presenza dei nutrienti necessari si verificano le condizioni metaboliche adatte alla crescita vegetativa.

## 2.2 Il Genere *Clostridium*

Appartiene alla forma anaerobia della famiglia *Bacillaceae*, microorganismi bastoncellari, generalmente Gram-positivi e produttori di endospore. La maggior parte delle specie possiede flagelli peritrichi e sono mobili, solo *C. perfringens* (Fig. 3) è immobile.

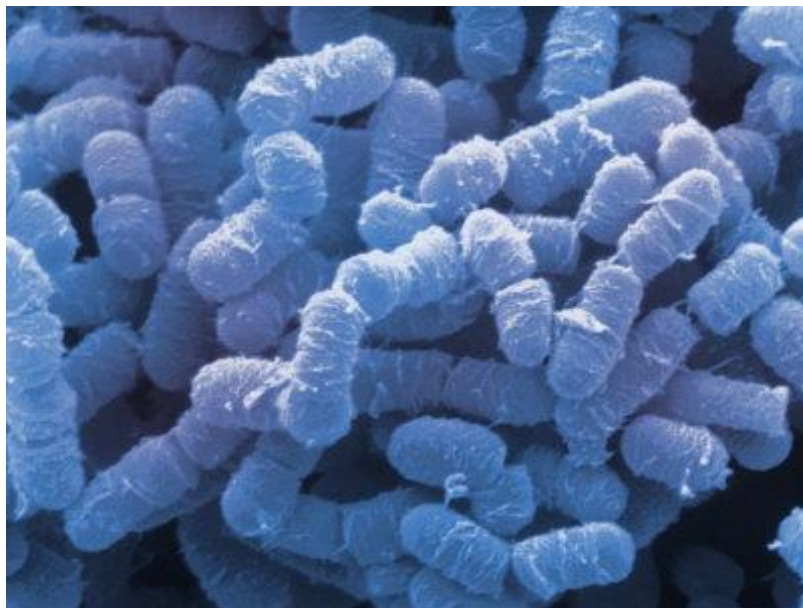


Fig. 3 – *C. perfringens*

Fonte:[http://www.allposters.it/-sp/Clostridium-Perfringens-Bacteria-are-Anaerobic-Food-Borne-Pathogens-Posters\\_i6016382\\_.htm](http://www.allposters.it/-sp/Clostridium-Perfringens-Bacteria-are-Anaerobic-Food-Borne-Pathogens-Posters_i6016382_.htm)

Quasi tutti i clostridi compiono la fermentazione butirrica con produzione di grandi quantità di gas (principalmente CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>). Il loro sviluppo deve avvenire in atmosfera strettamente anaerobia (90% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) in cui il potenziale di ossido-riduzione è molto basso.

Nel genere *Clostridium* si distinguono gli agenti eziologici del tetano (*Clostridium tetani*), gli agenti eziologici del botulismo (*Clostridium botulinum*) e della gangrena gassosa; quest'ultima è certamente l'infezione anaerobica più conosciuta, ed è causata da numerose specie del genere *Clostridium* (*C. histolyticum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. bifermentans*, *C. fallax*).

### 2.2.1 La specie *C. botulinum*

È un batterio gram-positivo, anaerobio obbligato (in grado di svilupparsi solo in condizioni di ossigeno inferiori al 2%), mobile per flagelli peritrichi. Ha forma bacillare ad estremità arrotondate e si presenta isolato, accoppiato o in catene talvolta anche lunghe (Verona, 1977).

Sporigeno, in condizioni sfavorevoli produce spore ovoidali a posizione centrale, subterminale o terminale che eccedono in larghezza il diametro della cellula batterica. Le spore sono distrutte a 120 °C in 3 minuti, mentre resistono per 3-5 ore a 100 °C e divengono molto meno resistenti se il pH si abbassa (Verona, 1977), anche se sono comunque in grado di crescere in ambiente acido (ma con pH > 4.5); sono infatti particolarmente resistenti quando il pH del mezzo si aggira intorno alla neutralità.

Le spore e le cellule vegetative del *C. botulinum* possono essere ritrovate ovunque anche se è frequente, più che altrove, negli strati superficiali del terreno (Verona, 1977).

Tuttavia la permanenza nel terreno della cellula vegetativa o, ciò che ha importanza ai fini epidemiologici, la sua aggressività, va messa in rapporto ai fenomeni di variazione che possono determinarsi nel particolare ambiente edafico oppure anche agli insorgenti fenomeni di antagonismo e competizione microbica, sì che il terreno non sempre o limitatamente appare causa di trasmissione e diffusione dei microbi patogeni per l'uomo e gli animali da allevamento (Verona, 1977).

In condizioni sfavorevoli quindi vi è la sporulazione con spore che risultano dormienti e hanno la capacità di resistere per anni sia al gelo sia alla siccità.

*C. botulinum* è stato inoltre ritrovato, oltre che nel suolo, anche nelle matrici vegetali in decomposizione, nei margini di laghi e di pozze d'acqua (Huss, 1980; del Mar Gamboa et al., 2005; Songer and Post, 2005d) e negli effluenti di allevamento di maiali e bovini (Dahlenborg et al., 2001; Dahlenborg et al., 2003).

Tale microrganismo si può trovare anche nel contenuto intestinale di molte specie animali, tra cui gli erbivori e i pesci, e in questi ultimi in particolare, nella Famiglia degli Sturioni (Verona, 1977) senza manifestazioni patologiche..

In determinate condizioni ambientali, ossia in mancanza di ossigeno e in ambienti scarsamente acidi e con temperature superiori a 30 °C, avviene la germinazione delle spore, la moltiplicazione delle forme vegetative e la successiva produzione della tossina botulinica, un'esotossina di natura proteica, la più tossica finora conosciuta, che rappresenta uno dei più potenti veleni naturali esistenti al mondo.

In figura 4 è riportato un esempio del ciclo di propagazione della malattia a partire dalla presenza di spore nel fango del fondo delle paludi: è accertato che tutti gli animali nella palude (non solo gli

uccelli, ma anche pesci, rane, invertebrati) le ingeriscono assieme al fango e all'acqua che accompagnano il loro cibo. Ciò non provoca alcun problema agli animali che risultano in qualche modo dei "portatori sani": infatti, i tessuti vivi non offrono alle spore del *C. botulinum* le condizioni favorevoli per germinare, situazione che diventa possibile allorché, per un qualsiasi motivo accidentale, l'animale "portatore sano" morirà e il batterio potrà trovarvi un substrato ottimale. I tessuti morti, che costituiscono infatti il terreno di coltura proteico, temperature elevate specialmente d'estate e i processi di putrefazione che consumano tutto l'ossigeno risultano fattori favorevoli alla germinazione delle spore e moltiplicazione delle cellule vegetative con produzione di tossina. Ciò fortunatamente non avviene in tutti i casi, ma deve essere associato ad altre condizioni favorevoli alla germinazione delle spore, come ad esempio temperature dell'acqua superiori a 25 °C, eccessivo carico di nutrienti, nell'acqua o nel sedimento, abbondanza di mosche, intense fioriture algali.

Successivamente la carcassa in putrefazione attira le mosche che vi depongono le loro uova; le larve che si sviluppano consumano la carne della carcassa, ingerendo e accumulando la tossina nei tessuti, la quale non produce effetti agli invertebrati.

Infine le larve diventano parte della dieta per molti uccelli che ingerendo la tossina muoiono e diventano a loro volta carcasse contaminate dal *C. botulinum*.

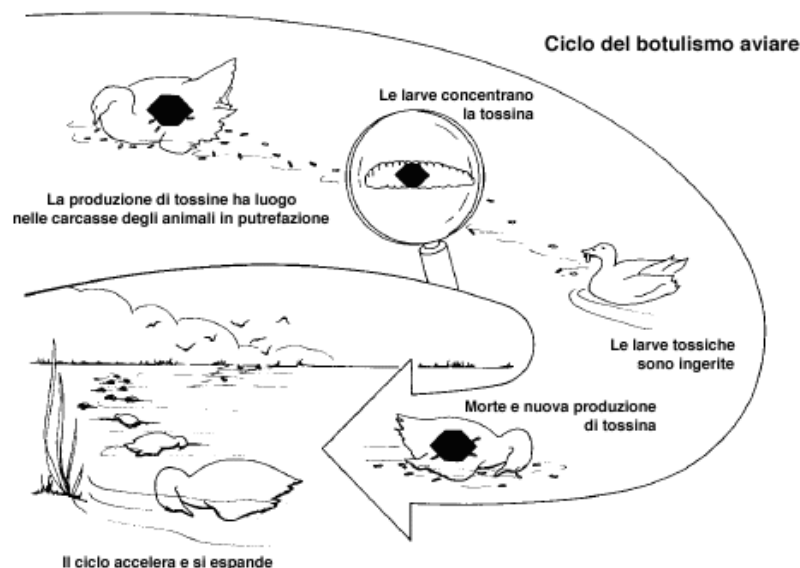


Fig. 4 - Il ciclo del botulismo aviare - fonte: U.S.G.S., *Waterfowl Management Handbook*

Il botulismo è infatti la conseguenza dell'introduzione di cibo nel quale il *C. botulinum* si sia sviluppato ed abbia prodotto quantità sufficienti di tossina (nell'uomo cibi in scatola, insaccati etc. dove è possibile si crei l'ambiente anaerobio adatto alla sua moltiplicazione) (Rosa e La Placa, 1965); si parla pertanto di intossicazione alimentare e non di infezione alimentare, in quanto il

botulismo è provocato dall'ingestione di alimenti nei quali vi è la presenza della tossina, non delle spore o del batterio vitale.

I ceppi di *C. botulinum* sono divisi in sette sierotipi distinti per tossina botulinica, descritti dalle lettere dell'alfabeto dalla A alla G. Questa tossina, termolabile (viene distrutta se sottoposta per circa 20 minuti a 80°C, o per 10 minuti a 90°C) e instabile a pH alcalini, ma estremamente attiva e acidoresistente, è costituita da un polipeptide a catena doppia: la catena leggera è un enzima proteasi che attacca una delle proteine della giunzione neuromuscolare, impedendo il rilascio di acetilcolina dalle vescicole. Inibendo il rilascio di questo neurotrasmettitore, la tossina interferisce con l'impulso nervoso e causa paralisi flaccida, ovvero ipotonica, dei muscoli caratteristica del botulismo e in contrapposizione con la paralisi spastica, ipertonica, osservata nel tetano.

I diversi ceppi di *C. botulinum* vengono classificati in quattro gruppi di organismi che possiedono caratteristiche metaboliche e fenotipiche diverse:

- Gruppi I e II, che rappresentano i ceppi che causano il botulismo umano e che producono le neurotossine A, B, E, F,
- Gruppo III: microrganismi responsabili del botulismo animale. Producono tossine tipo C e D.
- Gruppo IV: *C. botulinum* tipo G. non è mai stato associato a casi di botulismo.
- *C. butyricum* produttore di neurotossine tipo E, e *C. baratii* produttore di neurotossine tipo F formano due nuovi gruppi metabolici.

La tossina botulinica è resistente all'azione dei succhi gastrici, pertanto i sintomi si verificano dopo 18-96 ore dall'ingestione del cibo, con disturbi visivi, difficoltà nella parola, paralisi flaccida, debolezza muscolare, diplopia, difficoltà del movimento, scoordinazione dei muscoli della faringe e dei muscoli volontari, e nei casi mortali, paralisi dei muscoli respiratori o arresto cardiaco.

Il botulismo si presenta in differenti forme nell'uomo, di seguito descritte:

- Il botulismo alimentare: *C. botulinum* può crescere ed elaborare le sue tossine in alimenti solo quando gli stessi si presentano in condizioni di anaerobiosi, basso contenuto salino e valori di pH maggiori di 4,5 (cibo conservato in scatola, insaccati).
- Il botulismo da ferita causato dalla contaminazione di una ferita con le spore di *C. botulinum* provenienti dall'ambiente.
- Botulismo da colonizzazione intestinale dell'adulto è una forma estremamente rara in tutto il mondo ed è il risultato della produzione di tossina nel lume intestinale di adulti e ragazzi.
- Botulismo infantile causata da clostridi neurotossigeni (*C. botulinum* e più raramente *C. butyricum* o *C. baratii*) che vengono ingeriti sotto forma di spora, sopravvivono all'acidità gastrica e raggiungono l'intestino.

- Botulismo da inalazione della tossina che non rappresenta *una forma naturale* della malattia. La malattia è dovuta al rilascio intenzionale o accidentale di tossina in forma di aerosol.

I primi tre casi sopra elencati riguardano anche gli animali da allevamento, dove il botulismo alimentare è principalmente riconducibile a matrici utilizzate per l'alimentazione contaminate dalla tossina come acque o foraggi, o da insilati ottenuti in condizioni non ottimali che hanno favorito la vegetazione delle spore di clostridi eventualmente presenti.

Negli ultimi anni è stato osservato un incremento delle segnalazioni di episodi di botulismo animale, fenomeno da imputare, secondo il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) nel Rapporto sull'attività di Sorveglianza e Ricerca del 2009, essenzialmente a tre aspetti (ISS, 2009):

- maggiore sorveglianza per i casi di influenza aviaria,
- aumento del sospetto diagnostico da parte dei medici veterinari e degli organi di vigilanza delle aree protette (Corpo Forestale dello Stato, Guardia Parco),
- recepimento della Direttiva Zoonosi che include il botulismo tra le patologie da sottoporre a sorveglianza.

Va altresì segnalato un progressivo miglioramento, specie negli ultimi anni, anche delle tecniche diagnostiche come la creazione di un database presso il CNRB per la raccolta di tutte le informazioni relative agli episodi di botulismo verificatisi in Italia, e lo sviluppo di nuove tecniche di laboratorio.

Oltre al botulismo in forma acuta fin qui trattato, sembrerebbe esistere anche un'altra variante denominata "botulismo cronico o viscerale", descritta dal Prof. H. Böhnelt dell'Università di Göttingen in Germania, caratterizzata dalla presenza delle tossine botuliniche nell'ultimo tratto digerente e responsabile di diffuse forme di patologie delle vacche da latte, come la ridotta produttività e per le quali non si riesce ad individuare una causa eziologica. Secondo Böhnelt una significativa componente della popolazione bovina tedesca sarebbe affetta da questa forma di botulismo sub-clinico, responsabile anche di una crescente mortalità sia negli animali domestici che selvatici.

Per quanto riguarda l'aumento di intossicazioni, in questo caso di tipo acuto, tra gli animali selvatici, in particolare tra gli uccelli acquatici, alcune tesi denunciano la distruzione di numerose aree umide, fatto che ha costretto gli uccelli acquatici a concentrarsi nelle poche rimaste, e alla rarefazione dei predatori naturali, i necrofagi in particolare, che hanno la preziosa funzione di eliminare velocemente le carcasse degli animali morti.

In riferimento alla presunta esistenza della variante cronica la Commissione per le Petizioni del Parlamento Europeo, alla luce di una recente richiesta (anno 2011) di un cittadino tedesco, che denunciava la diffusione del botulismo cronico tra i capi di bestiame registrata negli ultimi anni in Germania, di approfondire la questione, la Commissione ha così concluso : “ [...] *A differenza del botulismo acuto, su cui l'EFSA ha pubblicato nel 2005 un'opinione scientifica relativa al botulismo negli alimenti, il "botulismo cronico" in quanto sindrome zoonotica negli esseri umani non è stato ancora adeguatamente descritto. L'agente responsabile dell'infezione e la modalità di trasmissione non sono stati determinati. L'istituto federale tedesco per la valutazione del rischio (BfR) ha di recente escluso i classici mezzi di trasmissione relativi ai focolai di tossinfezione alimentare quali carni fresche e latte crudo. In assenza di conoscenze scientifiche fondamentali sul "botulismo cronico", la Commissione non può prevedere l'istituzione di un sistema di segnalazione obbligatoria per tale sindrome a livello dell'UE, in quanto occorre che esso si basi su criteri scientifici armonizzati che non possono essere attualmente identificati.*

*Finora nessuno Stato membro della UE ha riportato informazioni sul "botulismo cronico" nella relazione annuale sulle zoonosi stilata ai sensi della direttiva 2003/99/CE. Tuttavia, secondo la documentazione dei firmatari, la Germania ha incluso il botulismo cronico tra le malattie segnalabili, il che può contribuire alla raccolta di dati e al monitoraggio della sua evoluzione.*

*[...] la Commissione desidera ribadire che il batterio Clostridium botulinum non è contagioso e che il botulismo non è incluso nell'elenco di malattie segnalabili dell'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE).*

*Nel quadro della proposta della Commissione relativa a una nuova "legge sulla salute animale", la cui presentazione è prevista alla fine del 2012, si discuterà in merito a una base giuridica per l'assegnazione di priorità alle malattie per cui è stato suggerito l'intervento dell'Unione. Una volta adottata la nuova normativa sulla salute animale da parte del Parlamento europeo e del Consiglio, la Commissione potrebbe considerare di includere il botulismo tra le malattie da sottoporre all'esercizio di classificazione. Qualsiasi ipotetica richiesta di un parere dell'EFSA sui rischi per la salute umana e animale correlati al botulismo cronico implicherebbe l'utilizzo da parte della stessa di dati non ancora prodotti dagli Stati membri o dalla comunità scientifica internazionale. Tale richiesta può anche essere inviata da uno Stato membro.*

*Al momento la Commissione non è in grado di riconoscere il valore aggiunto delle azioni intraprese a livello dell'UE per risolvere il presunto problema del botulismo in Germania."*



### 3. Controversie sulla presenza di Clostridi e *C. botulinum* negli impianti di biogas

Alla luce di quanto argomentato relativamente al *C. botulinum*, facente parte di una nutrivissima documentazione scientifica, la tematica è recentemente ritornata in auge, come già anticipato, in seguito alla formulazione delle ipotesi di una possibile diffusione nell'ambiente di pericolose spore di Clostridium dovute ai processi anaerobici condotti negli impianti di biogas, sollevate in Germania dal Prof. H. Böhnel .

La contestazione, sollevata dal Prof. Böhnel durante un seminario dal titolo: *Botulism and other scares - how do we reassure the public on the safety of recycled organic wastes* [Botulismo e altri allarmi - come possiamo rassicurare il pubblico circa la sicurezza il riciclo degli scarti organici?] tenutosi nell'ambito del 16a European Biosolid & Organic Resources Conferences (Leeds, UK 14-16 novembre 2011), e successivamente sostenuta dal professore in numerosi convegni anche in Italia, denuncia che i digestati residui della produzione di biogas, utilizzati come fertilizzante, sono una causa altamente probabile dell'aumento di botulismo, in particolare della cosiddetta “forma cronica”, che interesserebbe sia gli animali, sia l'uomo.

Il Prof. Böhnel ha affermato che i Clostridi entrerebbero nel circuito dei digestori anaerobici attraverso svariate vie tra cui i liquami, gli scarti di macelli e le biomasse vegetali, nel caso queste ultime risultassero contaminate.

Successivamente le condizioni di temperatura (circa 35-37 °C) e pH (circa 7) nei reattori anaerobici favorirebbero la germinazione delle spore contenute nelle matrici in ingresso e la moltiplicazione dei Clostridi. La sopravvivenza delle cellule di *C. botulinum* e di altri patogeni sarebbe favorita anche da una eterogeneità delle condizioni fisiche all'interno dei digestori, come ad esempio temperature leggermente differenti in diversi punti, accumuli di materiale organico con funzione “protettiva” che si creano ad esempio sul fondo e sulla crosta superficiale nei digestori a causa di una miscelazione non ottimale della massa in fermentazione, cortocircuitazioni e contaminazione di digestato prossimo all'uscita con materiale fresco appena caricato.

Infine il batterio contenuto nel digestato in uscita si diffonderebbe, sia come spore che come cellule vitali, sul terreno in seguito allo spargimento da cui potrebbe entrare nuovamente nel circolo alimentare degli animali da allevamento.

Böhnel sostiene che esisterebbe una correlazione tra la presenza delle centrali a biogas e la recente insorgenza di nuovi casi di botulismo in Germania (1.000 dai dati ufficiali, 3.000 secondo Böhnel).

Sul tema alcuni ricercatori del CRPA (Centro ricerche sulle produzioni animali di Reggio Emilia) hanno effettuato delle indagini su eventuali rischi prodotti dai digestati residui degli impianti a biogas sulla filiera del Parmigiano Reggiano (*Biogas e Parmigiano-Reggiano: una coesistenza*

*possibile?* 2011). La sperimentazione, condotta nel 2009, si è avvalsa di reattori da laboratorio che simulavano il processo di digestione di biogas e ha ricercato la presenza di spore di Clostridium in generale. Sono stati condotti tre cicli di digestione anaerobica e per ogni ciclo, avvenuto in tre digestori che lavoravano in parallelo, in mesofilia (38-39°C) per una durata di 90 giorni, è stata inserita una matrice diversa: nel primo solo liquame bovino, nel secondo liquame bovino e insilato di mais e nel terzo liquame bovino e insilato di sorgo. Le analisi effettuate hanno evidenziato una differenza significativa tra il contenuto di spore dei digestati di reattori alimentati a liquame+silomais e liquame+silosorgo rispetto ai digestati provenienti dal reattore alimentato con solo liquame che presentava un contenuto di spore più basso e non significativamente diverso rispetto al materiale in ingresso.

Nella sperimentazione condotta in laboratorio la presenza di biomasse vegetali nell'alimentazione del digestore sembra aver influenzato l'aumento delle spore di Clostridi. Questi risultati sperimentali, come evidenziato dagli stessi autori, dovrebbero essere confermati con un "supplemento d'indagine", volto ad ampliare e verificare in campo i risultati ottenuti dalla sperimentazione di laboratorio".

Il recente articolo "*la digestione anaerobica riduce patogeni e odori*" pubblicato su Terra e Vita n. 8/2014 (V. Orzi et al. 2014) ha concluso che, per quanto riguarda i Clostridi e in questo caso la specie *C. perfringens*, il "*Clostridium perfringens mostra andamenti contrastanti, alle volte diminuendo dopo digestione anaerobica per poi aumentare nei separati solido e liquido. Comunque il contenuto nei digestati e derivati non è mai superiore agli ingestati, di fatto smentendo le voci secondo le quali la DA è responsabile della proliferazione di clostridi*" e poi "*i risultati indicano una sostanziale neutralità [dei processi anaerobici] in accordo con la letteratura internazionale, anche se è evidente, dopo digestione, una tendenza alla loro diminuzione*".

Altri lavori scientifici hanno analizzato l'evoluzione specifica nei digestori del *C. botulinum*. Nel lavoro della tesi dottorale di E. Bagge: "*Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteria*", (Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2009), il *C. botulinum* e le sue spore sono stati trovati vivi sia prima che dopo la pastorizzazione di letami in un impianto di biogas (il *C. botulinum* può infatti vivere nell'intestino degli animali senza causare malattia alcuna), ma non dopo la digestione anaerobica dello stesso letame. Nella tesi è stata formulata l'ipotesi che nei digestori potessero crearsi delle condizioni inibenti il *C. botulinum*, ipotesi che comunque dovrebbe essere consolidata da ulteriori studi.

Bagge ha inoltre riscontrato che alcuni digestati, privi di patogeni, risultavano contaminati dopo essere trasportati in camion che precedentemente avevano trasportato rifiuti da macellazione, e che evidentemente non erano stati sottoposti ai necessari trattamenti .

L'argomento in questione è stato affrontato anche nell'ambito di un convegno tenutosi il giorno 11 aprile 2012 in Germania, e precisamente nella città di Jena, dove il Dott. B. Köhler della Ripah-Labor GmbH di Potsdam ha presentato una statistica basata su 302 campioni prelevati in 80 impianti di diversi tipi (biogas agricolo, biogas da fanghi fognari, compostaggio, ecc.) nell'arco temporale fra 1980 e 2007. Le ricerche di Köhler hanno rilevato, in solo 2 dei 302 campioni analizzati, la presenza di tracce di tossine botuliniche (queste ultime non identificate a causa della loro bassa concentrazione), ma non su campioni di digestato; Köhler ha presentato inoltre un altro studio che riportava la presenza di tracce di tossina in soli 5 campioni di materiale prelevato in impianti di biogas su un totale di 74 nell'arco temporale 1990-2012.

Infine secondo uno studio pubblicato su *Biotechnology for Biofuels* 2013, *Eikmeyer et al.* dopo aver sequenziato il genoma presente in digestati provenienti da 7 impianti anaerobici tedeschi di diverse tipologie costruttive ed operative, hanno trovato sequenze genetiche di batteri dei generi *Escherichia* e *Clostridium*, ma nessuna indicava la presenza di specie patogene.

#### **4. La ricerca di *C. botulinum* negli impianti di biogas del Veneto**

ARPAV, nella struttura del Servizio Osservatorio Rifiuti - Osservatorio Regionale per il Compostaggio e dell'Osservatorio Suolo e Bonifiche, ha promosso nel 2012, in collaborazione con l'Università degli studi di Padova e l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, uno studio volto per approfondire la tematica della presenza di microrganismi patogeni nelle matrici trattate negli impianti di biogas e nei digestati prodotti da questi ultimi.

Dopo aver individuato tutti gli impianti presenti nel Veneto, ne sono stati selezionati sei sulla base delle biomasse trattate in ingresso:

- un impianto alimentato solo con liquame bovino;
- un impianto alimentato solo con liquame suino;
- due impianti misti (alimentato con liquami e biomasse);
- un impianto che tratta solo biomasse;
- un impianto alimentato a rifiuti organici da raccolta differenziata (FORSU - Frazione Organica del Rifiuto Solido Urbano e verde urbano ).

La scelta di inserire un impianto inserito nel ciclo dei rifiuti è stata effettuata per analizzare eventuali differenze o analogie tra questa tipologia di impianti e quelli esclusi dalla normativa sui

rifiuti e che solitamente vengono realizzati per il trattamento di effluenti di allevamento, biomasse e/o altri scarti e denominati comunemente “impianti agricoli”.

In tabella 1 sono elencate le principali caratteristiche tecniche degli impianti oggetto della sperimentazione.

La prima serie di campionamenti è stata eseguita sulle matrici in ingresso agli impianti, suddivise in dieci tipologie, come specificato in tab. 2.

La seconda serie di campionamenti è stata effettuata dopo aver atteso il tempo di ritenzione idraulica, calcolato per ogni impianto, al fine di prelevare il materiale in uscita approssimativamente derivante dai materiali oggetto della prima fase dei campionamenti.

In questa seconda fase erano previsti tre campioni per ciascun impianto, uno di digestato tal quale subito in uscita dal digestore, e due dopo separazione solido/liquido, uno della frazione liquida e uno della frazione solida. Nell'impianto S misto, a causa di lavori manutentivi di alcuni macchinari, non è stato possibile campionare la frazione solida, mentre l'impianto M non effettua nel suo processo alcuna separazione del digestato.

Impianto	Pre-trattamento	Matrici in ingresso	Quantità	Temperatura del digestore (°C)	Volume del digestore (m <sup>3</sup> )	HRT (giorni)	Potenza (kW/h)
F	No	Liquame bovino	72 m <sup>3</sup> /g	40	728	10	55-60
M	Vasca di equalizzazione di 250 m <sup>3</sup>	Liquame suino	39 m <sup>3</sup> /g	40	2200	57	300
A	Solo per il siero di latte vi è pastorizzazione a 70° per 4 h	Siero di latte	3 m <sup>3</sup> /g	40	5902	52	800
		Insilato di mais e triticale	7 ton/g				
		Liquame bovino	8 ton/g				
		Letame bovino	10 ton/g				
		Scarti alimentari	40 m <sup>3</sup> /g				
S	No	insilato di sorgo	10 ton/g	42	2 linee di digestione per un totale di 18748	58	999
		letame bovino	24 ton/g				
		liquame bovino	44 ton/g				
		insilato di mais	20 ton/g				
B	No	Insilato di mais	50 ton/g	42	2600	40	999
E	Triturazione vagliatura e deferrizzazione	FORSU	80-90 ton/g	37	2400	36	1330
		VERDE	20 ton/g				

Tab. 1 – Elenco di alcune caratteristiche tecniche degli impianti scelti.

IMPIANTO F (SOLO LIQUAME BOVINO)	LIQUAME BOVINO
IMPIANTO M (SOLO LIQUAME SUINO)	LIQUAME SUINO
IMPIANTO A (MISTO)	LIQUAME BOVINO
	SIERO DI LATTE
	LETAME BOVINO
	SCARTI ALIMENTARI
	INSILATO DI TRITICALE
	INSILATO DI MAIS
IMPIANTO S (MISTO)	INSILATO DI SORGO
	LETAME BOVINO
	LIQUAME BOVINO
	INSILATO DI MAIS
IMPIANTO B (SOLO BIOMASSE)	INSILATO DI SORGO E MAIS
IMPIANTO E (RIFIUTI ORGANICI)	FORSU
	VERDE

Tab. 2 - Elenco matrici in ingresso.

La ricerca delle spore di *C. botulinum* è stata effettuata dall'Istituto Zooprofilattico delle Venezie di Legnaro, mediante una procedura di analisi tratta da "Metodi di analisi degli alimenti – Rapporto ISTISAN 96/35", che ha previsto la ricerca delle spore del batterio con espressione dei risultati come Presenza/Assenza in 10 grammi di campione. Le analisi hanno riguardato un totale di 30 campioni (15 di materiali in ingresso e 15 digestati), i cui risultati sono riportati nelle due tabelle seguenti (tab. 3 per le matrici in ingresso e tab. 4 per i digestati).

Impianto	Tipologia materiale (MATRICI IN INGRESSO)	<i>C. botulinum</i> (P/A in 10 g)
A	Liquame bovino	negativo
A	Letame bovino	negativo
A	Siero di latte	negativo
A	Insilato di triticale	negativo
A	Scarti alimentari	negativo
A	Insilato di mais	negativo
M	Liquame suino	negativo
F	Liquame bovino	negativo
S	Liquame bovino	negativo
S	Letame bovino	negativo
S	Insilato di mais	negativo
S	Insilato di sorgo	negativo
B	Insilato di mais	negativo
E	FORSU	positivo
E	Verde	negativo

Tab. 3 – risultati relativi alla presenza di spore di *C. botulinum* nelle matrici in ingresso.

Impianto	Tipologia materiale (DIGESTATI)	C. botulinum (P/A in 10 g)
A	Digestato tal quale	negativo
A	Digestato liquido	negativo
A	Digestato solido	negativo
M	Digestato tal quale	negativo
F	Digestato tal quale	negativo
F	Digestato liquido	negativo
F	Digestato solido	negativo
S	Digestato tal quale	negativo
S	Digestato liquido	negativo
B	Digestato tal quale	negativo
B	Digestato liquido	negativo
B	Digestato solido	negativo
E	Digestato tal quale	negativo
E	Digestato liquido	negativo
E	Digestato solido	negativo

Tab. 4 – risultati relativi alla presenza di spore di *C. botulinum* nei digestati.

Dall'analisi dei risultati risulta che la ricerca delle spore di *C. botulinum* non ha evidenziato alcuna positività (presenza di spore) nei digestati analizzati, mentre è stata riscontrata una sola positività in ingresso all'impianto E, per il quale non sono comunque emerse positività in uscita. La presenza di spore nella FORSU potrebbe derivare a resti animali o alimenti contaminati contenuti nel rifiuto. I risultati in ingresso attestano pertanto una situazione di sicurezza per tutte le tipologie analizzate. I risultati in uscita indeboliscono la tesi per cui il digestore anaerobico operante in mesofilia possa rappresentare, per le sue caratteristiche chimico-fisiche (pH, anaerobiosi, temperatura, diversi strati all'interno a causa di miscelazione non ottimale, circuitazione idrauliche, potenziale redox), un ambiente ideale per lo sviluppo del *C. botulinum*. Il caso del digestore E, tra l'altro non dotato di sistemi di miscelazione all'interno e quindi maggiormente soggetto a depositi e stratificazioni, evidenzia che una positività in ingresso non è stata riconfermata dai campioni di digestato in uscita.

La motivazione potrebbe essere ricondotta, poiché dal punto di vista teorico l'ambiente chimico-fisico del digestore è favorevole al *C. botulinum*, all'elevata competizione fra tutte le popolazioni microrganismi che operano nelle varie fasi del processo all'interno del reattore. Da bibliografia scientifica si considera infatti la microflora competitiva come uno dei fattori limitanti la crescita del *C. botulinum*, presupposto che potrebbe essere correlato alla sua presenza in ambienti con scarsa competizione batterica, come ad esempio le conserve parzialmente sterilizzate.

E' inoltre importante precisare che la presenza di spore non necessariamente conduce alla produzione della tossina, in quanto non tutti i ceppi di *C. botulinum* sono in grado di produrla, e

rappresenta pertanto un fattore di rischio che dovrebbe essere confermato con la verifica dell'espressione dei geni che codificano per la tossina botulinica (con la necessaria tipizzazione sierologica).

Il caso di positività rinvenuto è pertanto solo potenzialmente in grado di produrre la tossina.

Lo studio condotto è da considerarsi una prima azione importante per chiarire se esistono interazioni tra il *C. botulinum* e la diffusione nel territorio degli impianti di digestione anaerobica. E' auspicabile che tale tematica, per la sua complessità ed importanza, possa comunque essere oggetto di successivi approfondimenti al fine di ottenere casistica ulteriore in grado di confermare quanto sin qui riscontrato.

## 5. Bibliografia

- APAT (2005). “*Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi*” manuali e linee guida 13/2005.
- Bagge E. (2009). “*Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteri*” Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala
- Böhnel H. (2011). “*Botulism and other scares - how do we reassure the public on the safety of recycled organic wastes?*”. European Biosolid & Organic Resources Conferences Leeds, UK, 14-16 novembre.
- Böhnel and Lube, 2000 da tesi di E. Bagge (2009). “*Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteri*”.
- Codato C. (2012) tesi di laurea “*Il digestato: caratterizzazione chimico-fisica ed analisi degli aspetti microbiologici*” Università degli studi di Padova.
- Dahlenborg et al., 2001; da tesi di E. Bagge (2009). “*Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteri*”.
- Dahlenborg et al., 2003 da tesi di E. Bagge (2009). “*Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteri*”.
- Del Mar Gamboa et al., 2005 da tesi di E. Bagge (2009). “*Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteri*”.
- Eikmeyer et al., (2013) “*Detailed analysis of metagenome datasets obtained from biogas-producing microbial communities residing in biogas reactors does not indicate the presence of putative pathogenic microorganisms*” *Biotechnology for Biofuels* 2013, 6:49.
- Huss, 1980 da tesi di E. Bagge (2009). “*Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteri*”.

- Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (2009). *“Rapporto sull’attività di Sorveglianza e Ricerca svolta nel 2009”*.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2006). *“Biologia dei microrganismi”*. Casa Editrice Ambrosiana.
- Masotti L. (1987). *“Depurazione delle acque”*. Bologna: Edizioni Calderoni.
- Orzi V. et al. (2014). *“La digestione anaerobica riduce patogeni e odori”* Terra e vita n. 8/2014.
- Rosa A. e La placca M. (1965). *“Appunti di microbiologia”*. Bologna: Libreria Universitaria.
- Sidhu J. E Toze S. (2009). *“Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature Review”*. Environment International (35): 187-201.
- Songer and Post, 2005d da tesi di E. Bagge (2009). *“Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteri”*.
- Vecchia P. e Piccinini S. (2011). *“Biogas e Parmigiano-Reggiano: una coesistenza possibile?”*. Agricoltura (48):22-26.
- Verona O. (1977). *“Microbiologia agraria”*. Seconda edizione UTET.



**Servizio Osservatorio Rifiuti – Osservatorio Regionale per il Compostaggio**

Via Santa Barbara, 5A

31100 Treviso, Italy

Tel. +39 0422 558640/648

Fax +39 0422 558516

E-mail: [src@arpa.veneto.it](mailto:src@arpa.veneto.it)

**Servizio Osservatorio Suolo e Bonifiche**

Via Santa Barbara, 5A

31100 Treviso, Italy

Tel. +39 0422 558620

Fax +39 0422 558516

E-mail: [ssu@arpa.veneto.it](mailto:ssu@arpa.veneto.it)

Luglio 2014