



RAPPORTI ISTISAN 17|5

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Microbiologia delle acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici e aspetti di economia ambientale

A cura di
L. Mancini, S. Marcheggiani,
F. Volpi, C. Romanelli



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Microbiologia delle acque industriali
utilizzate nel settore dei dispositivi medici
e aspetti di economia ambientale**

A cura di
Laura Mancini (a), Stefania Marcheggiani (a),
Fabrizio Volpi (a), Cristina Romanelli (b)

*(a) Dipartimento di Ambiente e Salute
(b) Organismo Notificato Unificato 0373*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
17/5

Istituto Superiore di Sanità

Microbiologia delle acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici e aspetti di economia ambientale.

A cura di Laura Mancini, Stefania Marcheggiani, Fabrizio Volpi, Cristina Romanelli
2017, iii, 45 p. Rapporti ISTISAN 17/5

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la qualità microbiologica dell'acqua utilizzata nella produzione dei dispositivi medici presso 16 produttori che hanno compilato un questionario sulla gestione e controllo delle principali attività relative al funzionamento e la manutenzione dei sistemi di trattamento dell'acqua coinvolti nel processo di fabbricazione. I campioni sono stati prelevati una volta al mese per tre mesi consecutivi. Per ogni azienda sono stati individuati cinque punti di campionamento. I parametri microbiologici sono stati la conta batterica totale a 22°C e 37°C. Sono stati sviluppati protocolli per la rilevazione di indicatori di contaminazione fecale: *Escherichia coli*, enterococchi intestinali, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. I risultati hanno evidenziato la presenza costante di *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp. nei diversi punti di campionamento, anche quando la conta batterica totale a 22°C e 37°C era entro i limiti di norma. Enterococchi fecali e *E. coli* sono stati occasionalmente rilevati, mentre *Salmonella* spp. non è mai stata identificata. Inoltre, sono state approfondite alcune tematiche quali il biofilm nelle acque e i principi di economia ambientale connessi alla gestione delle risorse idriche.

Parole chiave: Qualità microbiologica dell'acqua; Dispositivi medici; Processi industriali

Istituto Superiore di Sanità

Industrial water microbiology used in medical devices and aspects of the economy environmental.

Edited by Laura Mancini, Stefania Marcheggiani, Fabrizio Volpi, Cristina Romanelli
2017, iii, 45 p. Rapporti ISTISAN 17/5 (in Italian)

The objective of this work was to evaluate the microbiological quality of water used in manufacturing medical devices produced by 16 manufacturers, who filled in a questionnaire on the management and control of the main activities related to the operation and maintenance of water treatment systems involved in the manufacturing process. Samples were taken once a month for three consecutive months. For each site five sampling points were identified for each manufacturer. The microbiological parameters assessed were Total Bacterial Load (TBL) at 22°C and 37°C. Protocols were developed for the detection of faecal contamination indicators: faecal Enterococci and *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *Salmonella* spp. The results showed the constant presence of *Pseudomonas* spp., and *Staphylococcus* spp in the different sampling points, even when the TBL at 22°C and 37°C did not exceed the limits. Faecal enterococci and *E. coli* were occasionally detected, while *Salmonella* spp. was constantly absent in culture tests. Moreover, some issues were explored such as the presence of the biofilm in waters and the principles of environmental economics related to the management of water resources.

Key words: Water quality; Medical devices; Industrial processes

Questo documento è stato realizzato nell'ambito dell'accordo di collaborazione tra Istituto Superiore di Sanità e Ministero della Salute "Qualità delle acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici".

Per informazioni su questo documento scrivere a: laura.mancini@iss.it

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

Citare questo documento come segue:

Mancini L, Marcheggiani S, Volpi F, Cristina Romanelli C (Ed.). *Microbiologia delle acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici e aspetti di economia ambientale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/5).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*
Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Premessa	iii
-----------------------	-----

Qualità delle acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici: il progetto

<i>Laura Mancini, Stefania Marcheggiani, Anna Maria D'Angelo, Cinzia Grasso, Silvana Caciolli, Emilio D'Ugo, Massimiliano Bugarini, Roberto Giuseppetti, Camilla Puccinelli, Filippo Chiudioni, Fabrizio Volpi, Elisabetta Volpi, Alessandro Pinter, Mario Figliomeni, Elio Pierdominici, Cinzia Ferrari, Cristina Romanelli, Maria Rosaria Lombardi, Giuseppina Terzulli, Graziella Quinci</i>	1
Allegati al capitolo	
A1. Questionario informativo	16
A2. Schemi dei protocolli utilizzati per la determinazione dei microrganismi	18

Il biofilm: la vita sociale dei batteri come problema tecnologico

<i>Marco Faimali, Giovanni Pavanello, Raffaella Cardente, Franco Baroncelli</i>	24
---	----

Aspetti economici nella gestione delle risorse idriche: la valutazione economica degli usi dell'acqua

<i>Stefano Fabiani, Riccardo Grifoni</i>	34
--	----

PREMESSA

L'accordo di collaborazione "Qualità delle acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici" tra Istituto Superiore di Sanità e Ministero della Salute è nato nel 2012 dalla necessità di approfondire le conoscenze sulla qualità microbiologica delle acque utilizzate nei processi di fabbricazione dei dispositivi medici.

Lo studio è stato dedicato alla valutazione della qualità microbiologica delle acque industriali utilizzate nei processi di fabbricazione di varie tipologie di dispositivi medici prodotti in Italia, in assenza di specifiche linee guida.

Per gli aspetti microbiologici dell'acqua utilizzata nella produzione dei dispositivi medici, infatti, non sono ancora state emanate delle linee guida dedicate, ma vengono mutate quelle già applicate al settore farmaceutico che, per molti aspetti, risulta sovrapponibile a quello dei dispositivi medici.

Di conseguenza, la caratterizzazione microbiologica delle acque, utilizzate nelle varie fasi della produzione industriale, ha riguardato i parametri già previsti dalla Farmacopea (Italia, 2008; Italia, 2010) e altri microrganismi patogeni, oltre agli indicatori di inquinamento fecale (DL.vo 31/2001).

Con il progetto si è voluto raccogliere dati sulla tipologia, utilizzo e controllo dei sistemi di trattamento dell'acqua di processo predisposti dalle aziende del settore dei dispositivi medici e sull'incidenza dell'eventuale formazione di biofilm nei sistemi di trattamento dell'acqua.

Il rapporto contiene il resoconto delle attività che hanno portato alla redazione finale della linea guida "Linea guida italiana sugli aspetti microbiologici delle acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici" pubblicata sul portale del Ministero della Salute.

Inoltre, sono affrontate alcune tematiche quali quella inerente la presenza del biofilm nelle acque e i principi di economia ambientale connessi alla gestione delle risorse idriche.

I curatori

QUALITÀ DELLE ACQUE INDUSTRIALI UTILIZZATE NEL SETTORE DEI DISPOSITIVI MEDICI: IL PROGETTO

Laura Mancini (a), Stefania Marcheggiani (a), Anna Maria D'Angelo (a), Cinzia Grasso (a), Silvana Cacioli (a), Emilio D'Ugo (a), Massimiliano Bugarini (a), Roberto Giuseppi (a), Camilla Puccinelli (a), Filippo Chiudioni (a), Fabrizio Volpi (a), Elisabetta Volpi (a), Alessandro Pinter (a), Mario Figliomeni (a), Elio Pierdominici (a), Cinzia Ferrari (a), Cristina Romanelli (b), Maria Rosaria Lombardi (c), Giuseppina Terzulli (c), Graziella Quinci (c)
(a) Dipartimento di Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Organismo Notificato Unificato 0373, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(c) Direzione Generale dei Dispositivi Medici e del Servizio Farmaceutico, Ministero della Salute, Roma

Articolazione del progetto

Il progetto, si è articolato in diverse fasi: individuazione delle tipologie e classi dei dispositivi medici, messa a punto e applicazione di un questionario informativo e di protocolli sperimentali, organizzazione di incontri con le aziende per la presentazione del progetto.

I risultati delle analisi sperimentali hanno permesso la realizzazione e pubblicazione di una linea guida sul portale del Ministero della Salute (Mancini *et al.*, 2015) e la sua disseminazione.

Individuazione delle tipologie e classi dei dispositivi medici

Il Dipartimento Ambiente e Salute (Reparto Qualità Ambientale e Ittiocoltura) in collaborazione con l'Organismo Notificato Unificato 0373, ha selezionato le aziende da coinvolgere nello studio sulla base delle tipologie e delle classi dei dispositivi medici prodotti. Oltre alle aziende produttrici di dispositivi medici non iniettabili e prevalentemente ad uso topico, sono state selezionate anche quelle che producono tutti i dispositivi medici che prevedono l'uso di acqua sia nella produzione sia come componente, comprendendo, quando disponibili, anche i dispositivi medici iniettabili.

Le 16 ditte che hanno partecipato allo studio, sono state selezionate anche sulla base della posizione geografica, affinché questa fosse rappresentativa delle varie regioni italiane, così da contemplare eventuali variazioni dovute alle singole specificità del territorio.

Messa a punto di un questionario informativo

Le aziende selezionate producono differenti tipologie di dispositivi: medici, pomate, disinfettanti per dispositivi medici, ecc. È stato pertanto predisposto un questionario informativo volto a raccogliere dati sulle responsabilità, modalità di gestione e di controllo delle principali attività connesse con l'implementazione, l'utilizzo, la manutenzione dei sistemi di trattamento dell'acqua nelle aziende che realizzano dispositivi medici.

Come mostrato nell'Allegato A di questo capitolo, il questionario è articolato in diverse sezioni:

- Dati della ditta;
- Tipologia dei prodotti realizzati;

- Struttura degli ambienti di produzione e tipologia di acqua usata nel processo produttivo, controlli e trattamenti;
- Laboratorio;
- Riciclo acqua di processo;
- Formazione del personale;
- Manutenzione impianti;
- Verifiche ispettive;
- Eventi avversi.

Predisposizione di protocolli sperimentali per valutare la qualità microbiologica delle acque industriali

Protocollo di campionamento

Il campionamento rappresenta una fase cruciale dell'intero procedimento analitico (APAT/IRSA-CNR, 2003). Le fasi che precedono le analisi microbiologiche, cioè il campionamento, il trasporto e la conservazione del campione, sono da considerarsi parte integranti del processo poiché possono incidere sull'attendibilità e l'affidabilità dei risultati analitici; durante il prelievo, quindi, devono essere osservate le *buone pratiche di laboratorio* e le norme di settore (UNI EN ISO 19458:2006), evitando contaminazioni secondarie del campione.

Il campionamento deve essere eseguito da personale qualificato, il quale deve essere opportunamente formato e messo a conoscenza sia delle tecniche di campionamento sia degli accorgimenti tecnici necessari per la corretta esecuzione delle determinazioni richieste (UNI EN ISO 5667-3:2004; UNI EN ISO 5667-1:2007).

Si riporta di seguito il protocollo utilizzato.

Materiale necessario

Di seguito viene riportato il materiale necessario per il campionamento in sterilità, per l'etichettatura e la conservazione del campione.

1. *Etichetta/pennarello indelebile per identificare il campione.*
2. *Bottiglie sterili*
 - Bottiglie di vetro Pyrex (borosilicato), sterilizzate in laboratorio a calore secco (a circa 160°C per 60 minuti) o a calore umido (a circa 121°C per 20 minuti) in condizioni controllate.
 - Bottiglie monouso in materiale plastico (generalmente polietilene), disponibili in commercio già sterili.
3. *Flambatore per la sterilizzazione dell'ugello di prelievo*

Ove possibile, sterilizzare la bocca d'uscita del getto del campione.
Per la produzione della fiamma utilizzare gas propano o butano che permettono sia di raggiungere temperature più elevate sia di controllare la fiamma.
4. Frigo portatile per il mantenimento della temperatura.
5. Parafilm per la chiusura dei tappi

Prelievo per analisi microbiologiche

I volumi di acqua da prelevare vanno definiti in funzione dei parametri richiesti e devono essere superiori al minimo necessario per lo svolgimento delle analisi. Nella Tabella 1 sono riportate le quantità di campione necessarie per le singole analisi.

Tabella 1. Quantità di campione necessarie per le singole analisi

Microrganismo	Quantità di acqua da analizzare
CBT a 22°C	1 mL
CBT a 37°C	1 mL
<i>Escherichia coli</i>	100 mL
Enterococchi intestinali	100 mL
<i>Pseudomonas</i> spp.	250 mL
<i>Salmonella</i> spp.	1000 mL
<i>Staphylococcus</i> spp.	250 mL

CBT: Conta Batterica Totale

A seconda che il prelievo fosse effettuato dal rubinetto o da un pozzo o serbatoio, sono stati seguiti due protocolli:

– *Prelievo da un rubinetto*

Prima di effettuare il prelievo è necessario asportare, se presenti, tubi e guarnizioni in plastica e gomma. Nel caso di rubinetti metallici, è opportuno flambarne la bocca. Il flambaggio, tuttavia, se effettuato in modo superficiale, non esplica alcun effetto sull'eventuale presenza di contaminazione batterica.

Aprire il rubinetto e lasciare scorrere l'acqua per 3-5 minuti; i rubinetti, infatti, devono essere detersi per eliminare depositi, mucillagini, sostanze grasse o agenti disinfettanti che possono influenzare i risultati delle analisi microbiologiche. Il collo all'interno del rubinetto può essere sede di biofilm che, per quanto possibile, va eliminato.

Durante il prelievo devono essere osservate le buone pratiche, evitando che vi sia contaminazione secondaria del campione. Di conseguenza è necessario aprire la bottiglia sterile al momento del prelievo, tenendola dalla base, avendo cura di non toccare la parte interna del collo della bottiglia né la parte interna del tappo; il contenitore va riempito, senza modificare il flusso del rubinetto durante il prelievo. Le bottiglie e i contenitori utilizzati per prelevare campioni per analisi microbiologiche non devono mai essere sciacquati all'atto del prelievo in quanto il risciacquo espone i recipienti a possibili contaminazioni. Per consentire una efficace omogeneizzazione del campione al momento dell'analisi, è importante evitare di riempire completamente il contenitore. Si dovrebbe infatti lasciare uno spazio di circa 2,5 cm sotto il dispositivo di chiusura. Al termine del prelievo è importante chiudere immediatamente il tappo del contenitore e identificare il campione con un numero di riferimento o con i dati necessari per l'identificazione. Infine è necessario porre il campione alla temperatura di +4°C fino al momento dell'esecuzione delle analisi.

– *Prelievo da pozzo o serbatoio*

Nel corso dei prelievi di campioni di acqua ad uso industriale eseguiti nell'ambito del progetto, ci si è trovati a dover eseguire campionamenti direttamente da serbatoi. In questi casi, è necessario utilizzare bottiglie sterili incartate prima della sterilizzazione in modo da non contaminare l'acqua da prelevare. Utilizzando una pinza o un altro sistema idoneo (anch'esso sterilizzato e incartato fino al momento del prelievo), calare la bottiglia nel pozzo, immergendola completamente e lasciando che si riempia. Tirata fuori, è importante scartare i primi 2-3 cm di acqua per creare una efficace omogeneizzazione del campione al momento dell'analisi. Chiudere immediatamente il tappo della bottiglia e identificare il campione con un numero di riferimento o con i dati del campione necessari all'identificazione.

Le fasi successive ricalcano fedelmente quanto già indicato per i prelievi da rubinetto.

Etichettatura e identificazione campioni

Ogni campione deve essere facilmente identificabile fino al termine dell'analisi utilizzando un'etichetta applicata solidamente o, in alternativa, pennarelli indelebili. Se si utilizzano cartellini legati con un laccio, gli occhielli devono essere rinforzati. Un esempio di codifica campione è riportato nella Figura 1.

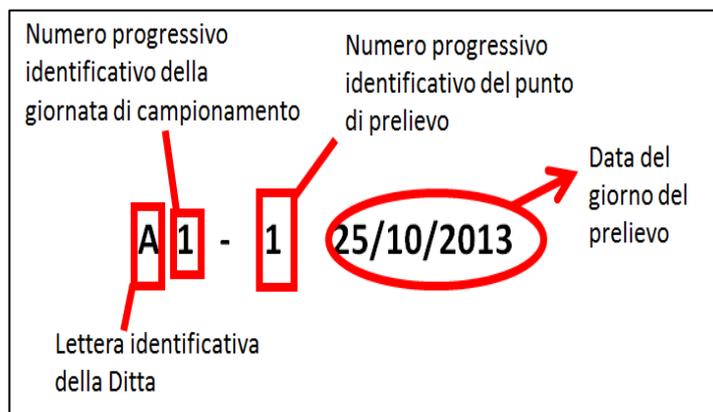


Figura 1. Esempio di codifica campione

La documentazione che accompagna il campione va messa in busta separata preferibilmente di plastica. È responsabilità del campionatore annotare tutti i dati di campionamento necessari sul modulo predisposto o sul registro.

I moduli compilati vanno archiviati.

Trasporto dei campioni

Durante il trasporto il campione deve essere mantenuto a +4°C.

Come ulteriore forma di protezione, il trasporto in laboratorio dei campioni dovrebbe essere fatto in contenitori secondari di metallo o di plastica, autoclavabili e resistenti ai disinfettanti chimici.

Spedizione

Mettere la bottiglia con il campione in una scatola di cartone robusto con un imballaggio sufficiente a garantire che non si danneggi durante la spedizione. Il vuoto lasciato nel collo della bottiglia compenserà l'eventuale espansione del liquido durante il trasporto. Mettere le bottiglie in una busta di plastica e sigillarla con una fascetta o con del nastro isolante. In questo modo, se si verificano perdite durante il trasporto, l'acqua non indebolirà l'imballaggio in cartone.

Compilare un foglio dati per ogni campione con i documenti necessari per l'identificazione e le successive analisi microbiologiche.

Inviare i campioni e i fogli dati a mezzo corriere o posta con numero di tracciamento. È utile comunicare per e-mail il nome del corriere e il numero di tracciamento, se si desidera che lo stato di spedizione del pacco sia monitorato. Al ricevimento dei campioni presso il laboratorio, con una e-mail o fax informare dell'arrivo dei campioni e del loro stato.

Ricezione di pacchi e loro apertura

Se le quantità dei campioni che si ricevono lo giustifica, sarebbe opportuno adibire una zona specifica per la loro ricezione.

I campioni devono essere aperti da personale informato delle procedure.
Gli involucri esterni dei campioni andrebbero comunque aperti su vassoi.

Registrazione e archiviazione

Sarà cura del personale addetto alle analisi, una volta arrivati in laboratorio, conservare i campioni in un frigorifero a temperatura controllata di +4°C. Il tempo che deve intercorrere tra il campionamento e le analisi microbiologiche non deve superare le 24 h; di norma si raccomanda di analizzare i campioni il giorno stesso del ricevimento in laboratorio (UNI EN ISO 5667-3, 1998).

In laboratorio registrare su apposito registro o su supporto informatico i dati identificativi del campione già precedentemente indicati, aggiungendo i seguenti:

- numero progressivo e data di registrazione;
- giorno e ora di ricevimento in laboratorio;
- modalità di conservazione nel trasporto;
- parametri da analizzare.

Protocolli per le analisi microbiologiche

Per le analisi microbiologiche è stato utilizzato un set di microrganismi patogeni e indicatori che rappresentano un possibile rischio per la salute umana, quali Conta Batterica Totale (CBT) a 22°C e a 37°C, *Pseudomonas* spp. (Garrity *et al.*, 2005; Palleroni, 2005; ISO, 2006), *Staphylococcus* spp. (Schleifer & Bell, 2009), *Salmonella* spp. (Popoff *et al.*, 2005; Popoff, 2001), *Escherichia coli* (Scheutz & Strockbine, 2009), Enterococchi intestinali (Švec & Devriese, 2009).

In Allegato A2 di questo capitolo sono riportati gli schemi dei protocolli utilizzati per la determinazione dei microrganismi.

Incontri con le aziende

In ogni azienda sono stati programmati un primo incontro per presentare lo scopo del progetto di ricerca e una serie di sopralluoghi successivi per poter svolgere i campionamenti necessari per le analisi di laboratorio.

In particolare, durante il primo incontro in ogni azienda è stato compilato, insieme ai responsabili e al personale dell'azienda, il questionario informativo; visitato l'impianto e stabilito il numero dei punti di campionamento, laddove possibile, in coincidenza con i normali punti di monitoraggio dell'azienda. Data la diversità dei sistemi di trattamento e distribuzione, sono stati individuati cinque punti comuni ad ogni azienda che fossero rappresentativi dell'impianto e dei possibili punti di criticità, così definiti:

- Punto 1 - acqua in ingresso;
- Punto 2 - acqua dopo trattamento con osmosi inversa;
- Punto 3 - acqua dopo secondo trattamento (distillazione, filtrazione, ecc.);
- Punto 4 - punto di prelievo nell'area lavaggio;
- Punto 5 - punto di utilizzo più lontano dal punto di ingresso.

La frequenza del campionamento è stata stabilita su base mensile con non meno di 3 ripetizioni successive. Alle aziende dove non è stato possibile effettuare o partecipare a tutti i prelievi, è stato consegnato un memorandum che fosse da guida nelle fasi di campionamento.

Risultati delle attività sperimentali

Sono di seguito riportati i risultati dell'attività sperimentale; in particolare, i dati raccolti tramite il questionario informativo e i risultati delle analisi microbiologiche.

Informazioni del questionario

Vengono riportati i risultati più significativi della somministrazione del questionario alcuni anche rappresentati graficamente per una migliore comprensione..

Il questionario, compilato sulla base delle interviste rivolte ai rappresentanti delle aziende durante i sopralluoghi, è ad uso esclusivamente interno poiché contiene dati sensibili, ma ha fornito elementi utili per elaborare le raccomandazioni presentate nella linea guida (Mancini *et al.*, 2015).

Dati dell'azienda

L'88% delle aziende ha dichiarato di avere un sistema di gestione della qualità certificato, il restante, invece, non ha attività sottoposte ad un sistema di gestione della qualità..

Il 75% delle aziende ha dichiarato di applicare le *Good Manufacturing Practice* (GMP).

La distribuzione del mercato di riferimento, rappresentato in Figura 2, sembra decisamente orientato per quello italiano e europeo.

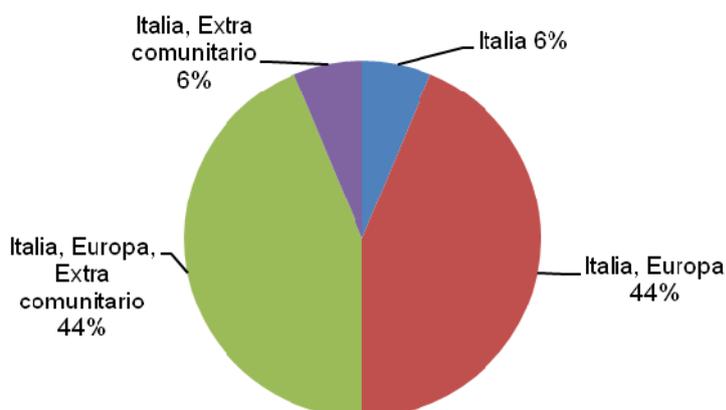


Figura 2. Mercato di riferimento commerciale delle aziende che producono dispositivi medici (fonte: aziende intervistate)

Prodotti

La distribuzione delle diverse classi di dispositivi medici prodotti dalle aziende è rappresentato in Figura 3.

La distribuzione delle diverse tipologie di dispositivi medici prodotti dalle aziende è rappresentato in Figura 4.

Il 63% delle aziende interpellate realizza cosmetici, integratori e farmaci. Il 6% delle aziende interpellate realizza biocidi.

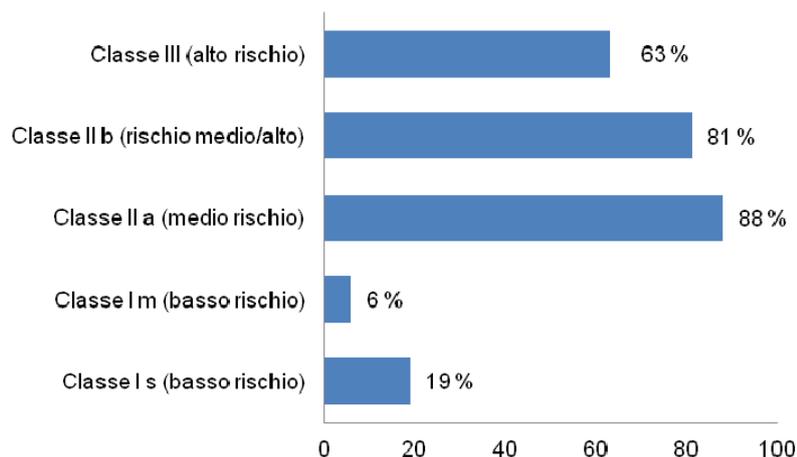


Figura 3. Classi di dispositivi medici prodotti dalle aziende che producono dispositivi medici (fonte: aziende intervistate)

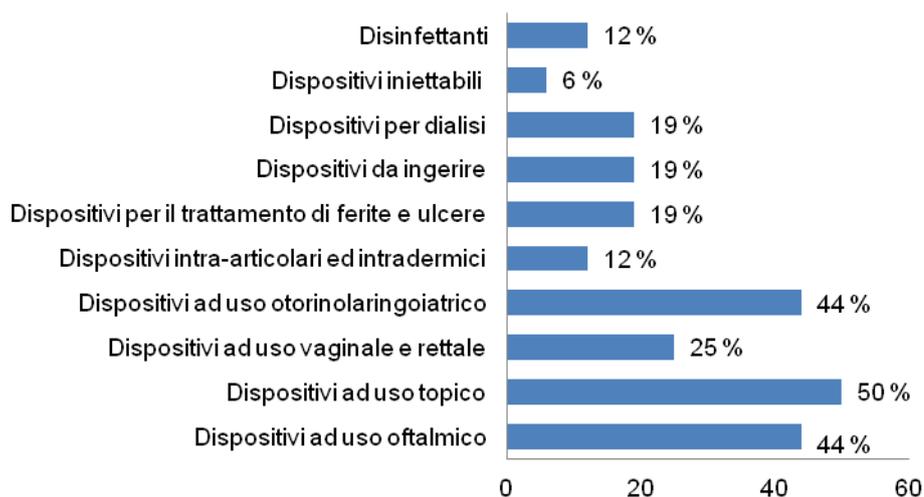


Figura 4. Tipologie di dispositivi medici prodotti dalle aziende produttrici (fonte: aziende intervistate)

Struttura

L'81% delle aziende hanno gli ambienti di produzione a contaminazione controllata. Di questi il 63% sono validati e il restante 37% non lo sono.

Produzione

L'acqua di rete è la tipologia di acqua che viene maggiormente utilizzata in ingresso al sistema di trattamento, come rappresentato in Figura 5.

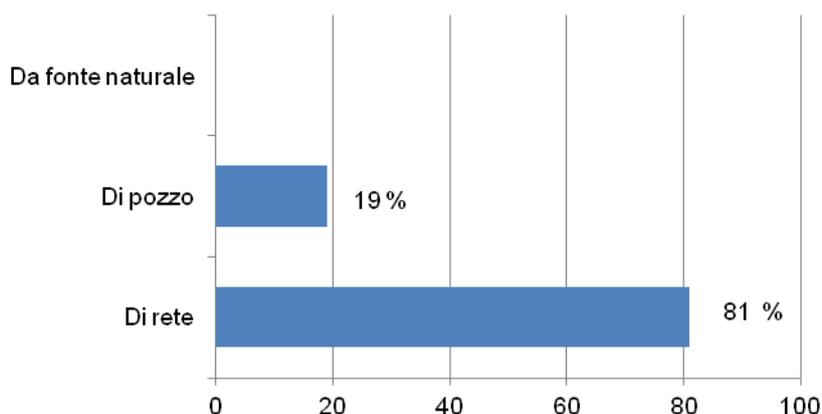


Figura 5. Ripartizione del tipo di acqua utilizzata in ingresso al sistema di trattamento dalle aziende produttrici di dispositivi medici (fonte: aziende intervistate)

L'88% delle aziende utilizza acqua potabile in ingresso, il restante 12% esegue la potabilizzazione.

Il 94% delle aziende esegue un pretrattamento (es. addolcimento, dechlorazione, filtrazione, ecc). Il 44% delle aziende esegue un trattamento per le acque per preparazioni iniettabili.

Il 94% delle aziende effettuano controlli microbiologici dell'acqua. Di questi, il 67% sono svolti internamente all'azienda, il restante 33% si affidano a laboratori esterni.

La periodicità delle attività di pulizia/sanificazione scelte dalle aziende sono riportate in Figura 6.

La modalità dell'attività di pulizia/sanificazione viene svolta per il 50% con vapore o acqua calda e il 50% con prodotti specifici.

Il 69% delle aziende durante le visite ispettive interne, prevede di esaminare anche le attività connesse al trattamento dell'acqua.

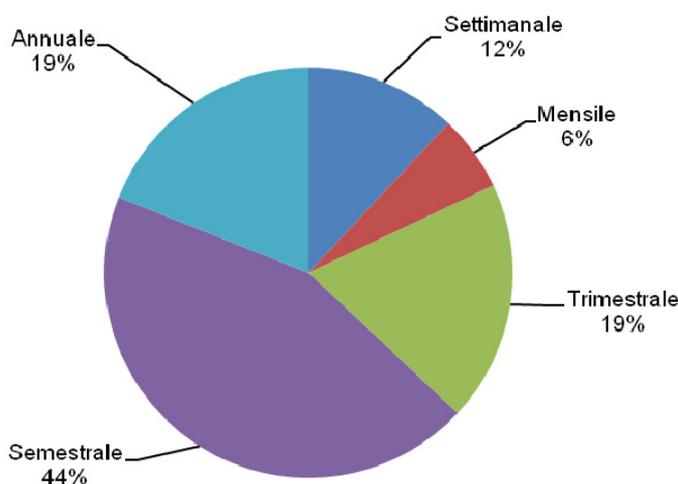


Figura 6. Periodicità delle attività di pulizia/sanificazione (fonte: aziende intervistate)

Approcci per il campionamento

Il 75% delle aziende ha dichiarato che gli operatori utilizzano i guanti durante le operazioni di prelievo.

Solo il 19% delle aziende ha dichiarato che gli operatori durante le attività di prelievo flambano l'ugello del punto di prelievo.

Solo il 12% delle aziende ha dichiarato che gli operatori utilizzano tubi di raccordo durante le attività di prelievo.

Il 94% delle aziende ha dichiarato che nelle proprie procedure di campionamento è previsto di fare scorrere l'acqua prima del prelievo.

Risultati delle analisi microbiologiche

Per ognuna delle 16 aziende, i campionamenti sono stati effettuati 1 volta al mese nei 5 punti di prelievo precedentemente stabiliti con le aziende, e ripetuti per 3 mesi; per ogni sito di prelievo, sono state condotte analisi per la ricerca di 7 parametri microbiologici, effettuando 3 repliche per ciascun parametro per un totale di 5040 analisi microbiologiche.

Per la gestione dei dati raccolti è stato creato e sviluppato un database in Microsoft Access e per l'elaborazione sono stati creati sei programmi distinti, contenenti una serie di comandi e di *query* SQL, per creare tabelle di metadati da cui estrarre le informazioni finali desiderate:

- Con il primo programma sono state create alcune tabelle di lavoro intermedie, in cui i dati sono stati riorganizzati, corretti e uniformati tramite una serie di procedure, al fine di ottenere un'unica tabella di riferimento per fare l'elaborazione dei dati.
- Il secondo programma ha creato una serie di tabelle relative alle chiavi di ricerca da utilizzare successivamente, per catalogare/filtrare i dati (es. lista delle ditte, lista dei parametri, ecc.)
- Il terzo programma ha eseguito una statistica descrittiva dei campioni rilevati, producendo varie tabelle, distinguendo i dati per ditta, prelievo, parametro, range di valori.
- Con ulteriori tre programmi sono state generate le tabelle di uscita finali per poter riassumere, e presentare anche a livello grafico, i dati dei campioni raggruppati per ditta, parametro, punto di prelievo, ecc., al fine di mostrare le distribuzioni percentuali, gli andamenti e i confronti tra coppie di parametri (Figura 7).

La Farmacopea europea fissa i limiti microbiologici per la Conta Batterica Totale (CBT) a 100 UFC/mL (Unità Formanti Colonie) per l'acqua depurata.

CBT a 22°C risulta maggiore di 100 UFC/mL nel 51% dei campioni analizzati, mentre CBT a 37°C nel 49% dei casi.

CBT come unico parametro da ricercare, anche con il limite di 100 UFC/mL, non esclude la presenza di *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. ed *Escherichia coli* (Figure 8-10).

Dei 190 campioni che presentano valori positivi per i parametri ricercati, il 2% risulta positivo per *E.coli*, il 3% per Enterococchi, il 63% per *Pseudomonas* spp. e il 32% per *Staphylococcus* spp. (Figura 11). Le analisi per *Salmonella* spp. sono sempre risultate negative.

Le Figure 12-15 rappresentano la distribuzione dei parametri ricercati nei siti campionati.

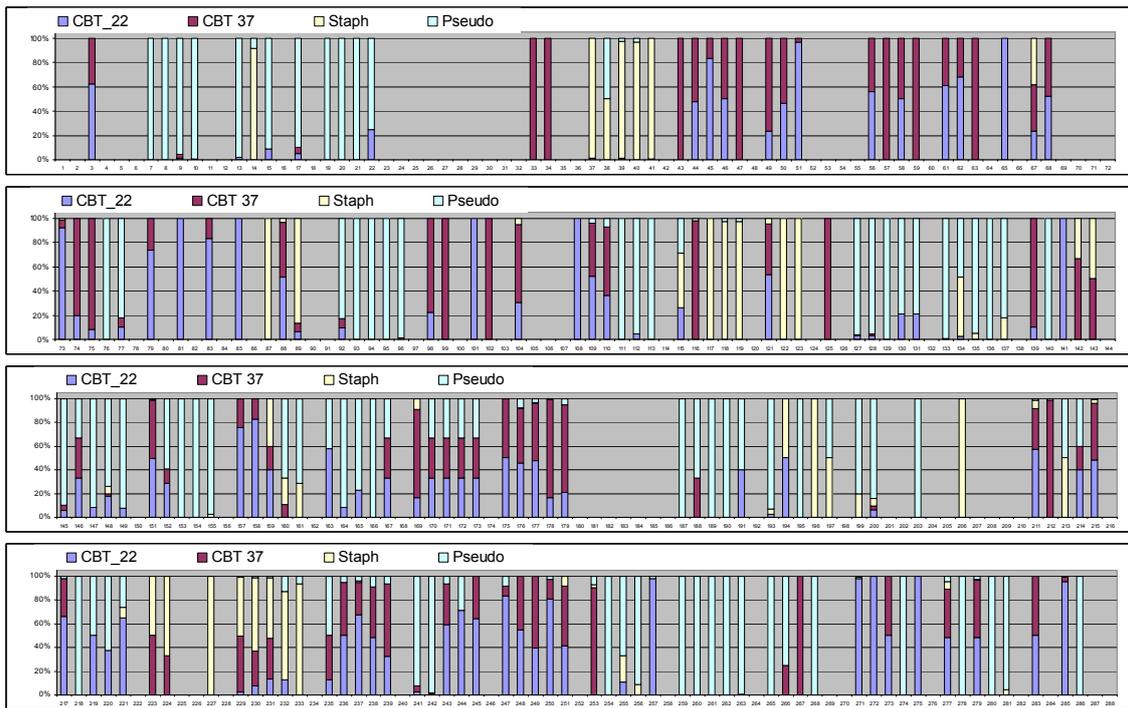


Figura 7. Confronto % tra i quattro parametri indicati, in ogni punto a parità di data di campionamento. Le ditte (A-R) sono separate dalle linee tratteggiate

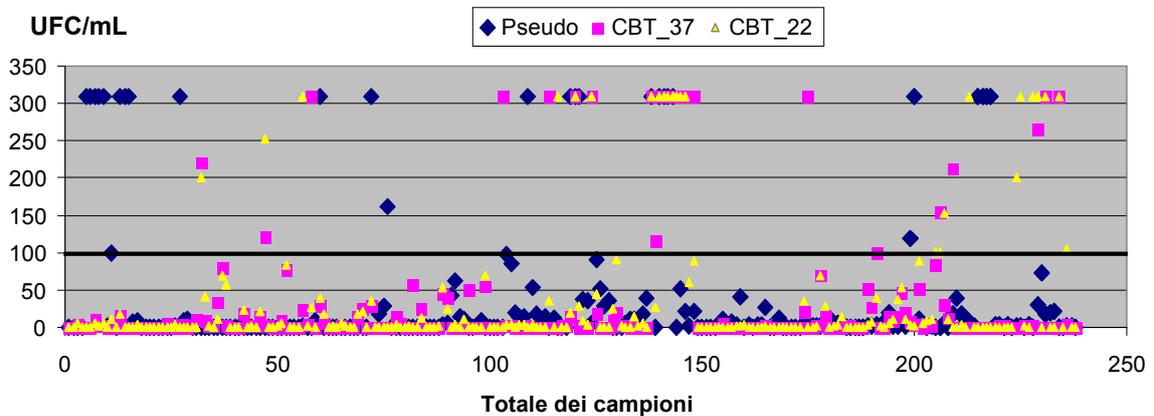


Figura 8. Valori di *Pseudomonas* spp. confrontati con la CBT a 22°C e a 37°C, per il totale dei campioni, in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

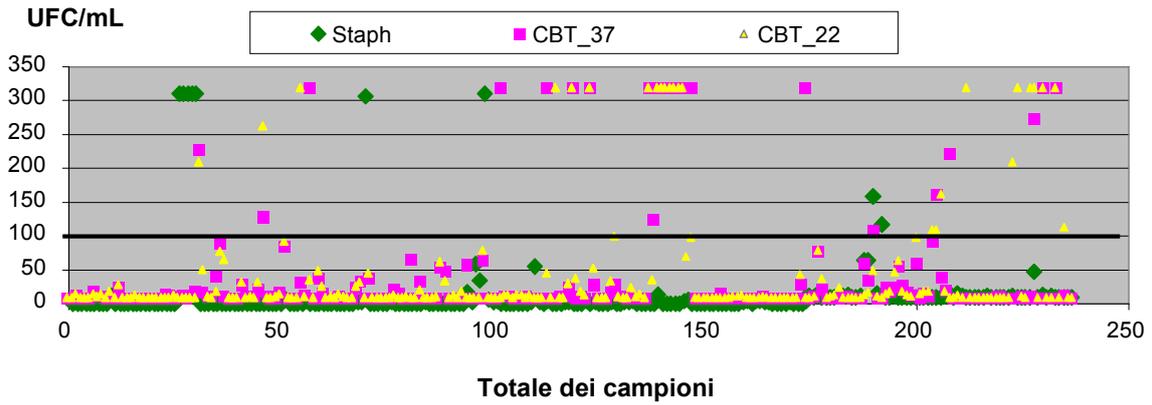


Figura 9. Valori di *Staphylococcus* spp. confrontati con la CBT a 22°C e a 37°C, per il totale dei campioni, in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

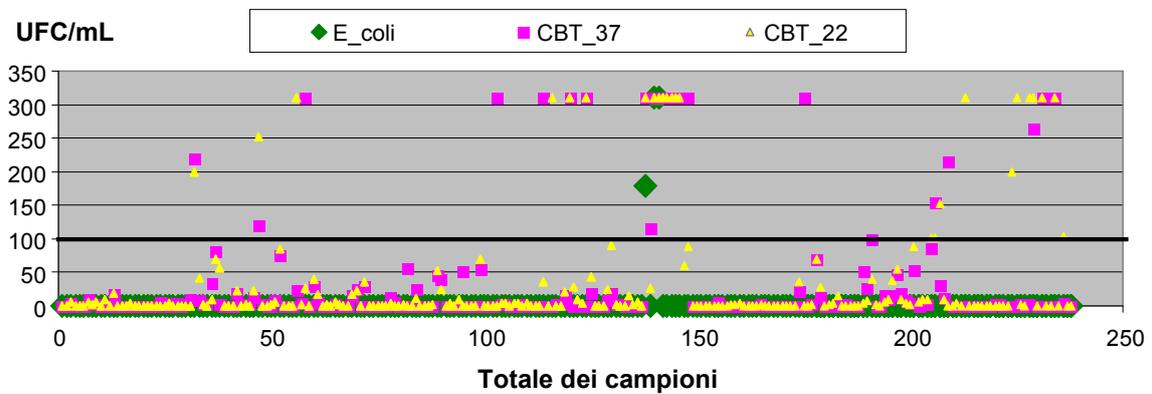


Figura 10. Valori di *Escherichia coli* confrontati con la CBT a 22°C e a 37°C, per il totale dei campioni in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

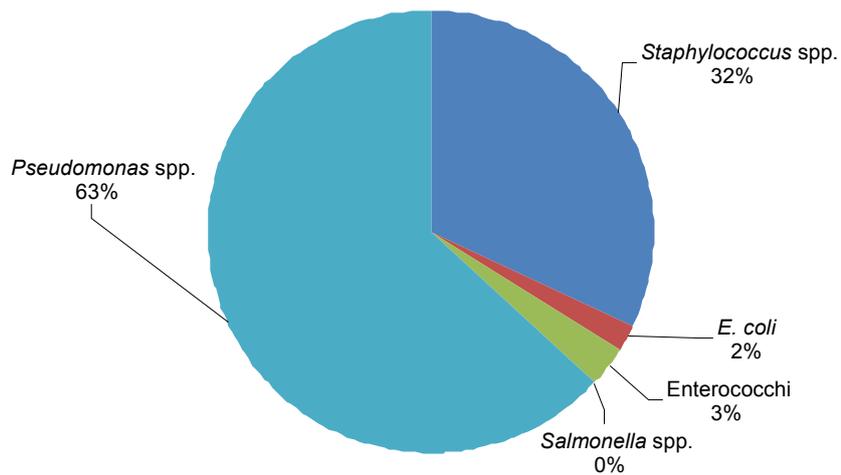


Figura 11. Percentuali di campioni che presentano valori positivi, divisi per patogeni e indicatori

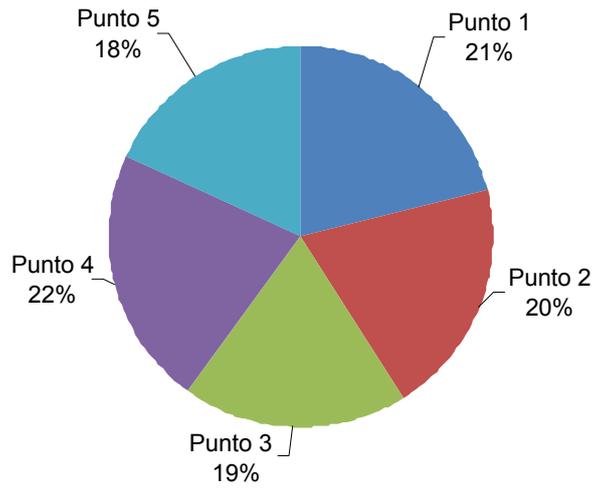


Figura 12. Campioni positivi per *Pseudomonas* spp. (119 campioni), divisi per punti di prelievo

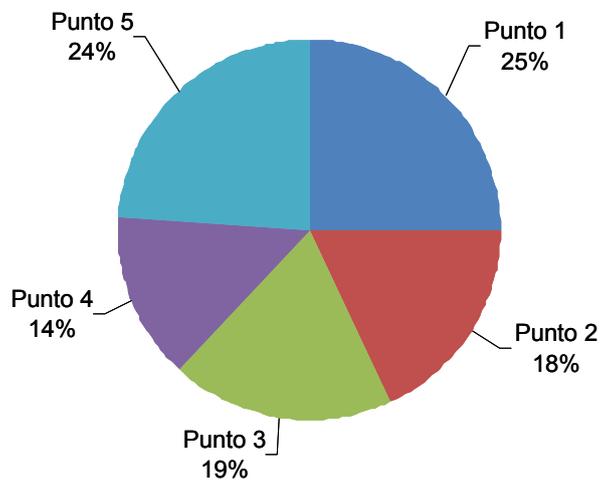


Figura 13. Campioni positivi per *Staphylococcus* spp. (63 campioni), divisi per punti di prelievo

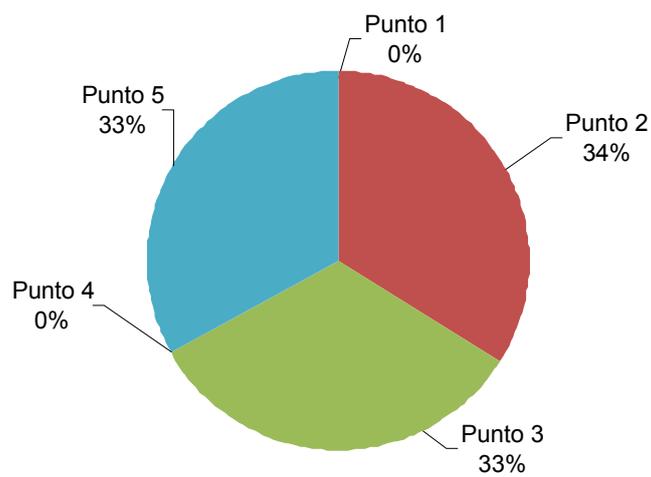


Figura 14. Campioni positivi per *Escherichia coli* (3 campioni), divisi per punti di prelievo

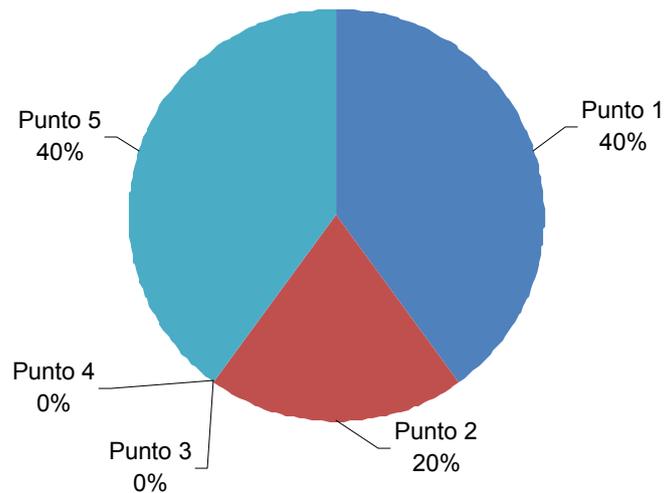


Figura 15. Campioni positivi per Enterococchi intestinali (5 campioni), divisi per punti di prelievo

Disseminazione

Il 1° ottobre 2013 presso l'Istituto Superiore di Sanità si è tenuta la giornata di Studio "Metodologie microbiologiche per le acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici" per comunicare agli addetti ai lavori lo stato di avanzamento del progetto.

L'11 e il 12 dicembre 2014 a Roma, presso l'Istituto Superiore di Sanità, si è tenuto il Convegno nazionale "Le acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici". In quell'occasione sono stati presentati i risultati del progetto, tra cui un'analisi statistica della qualità dell'acqua utilizzata dalle aziende italiane produttrici di dispositivi medici a partire dalle risultanze sperimentali sui campionamenti eseguiti, uno studio sullo stato dell'arte in termini di trattamenti e di controlli svolti sulle acque utilizzate, nonché la linea guida. Lo scopo del convegno è stato fornire supporto sia all'industria che ai laboratori di analisi che lavorano nel settore dei dispositivi medici.

L'evento, organizzato in collaborazione con il Ministero della Salute, è stato l'occasione per mettere a confronto le esperienze di varie aziende e operatori del settore nel formulare delle soluzioni alle criticità ed ai problemi emersi, condividendo le raccomandazioni espresse nella linea guida per favorirne l'adozione nella pratica.

È stata predisposta una sessione dedicata ai poster nella quale i partecipanti hanno descritto con maggiore accuratezza aspetti particolari o esperienze legati al progetto.

Considerazioni conclusive

Tracciare la linea delle conclusioni a 36 mesi del progetto è complesso poiché, al di là degli obiettivi prefissati e raggiunti, molta attività collaterale è stata svolta per conseguirli. Un percorso lungo che ci ha fatto conoscere realtà produttive significative per il Paese Italia con la piena disponibilità dei responsabili per raggiungere gli obiettivi del progetto condiviso.

Lo studio è stato articolato in varie fasi: dalla individuazione di eventuale letteratura di settore che si è dimostrata scarsa o totalmente assente, alla stesura di un questionario e alla sua compilazione presso le aziende, scelte sulla base dei dispositivi medici prodotti, in cui l'acqua gioca un ruolo chiave, e della distribuzione geografica. Dall'esperienza e dai risultati acquisiti con questo studio sperimentale, è stata redatta la "Linea guida italiana sugli aspetti microbiologici delle acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici", dedicata alle raccomandazioni per il controllo microbiologico delle acque utilizzate nella produzione dei dispositivi medici (D'Ugo *et al.*, 2016; Marcheggiani *et al.*, 2016).

La metodologia utilizzata per redigere la linea guida ha tenuto conto di quanto riportato nel Manuale Metodologico del Sistema Nazionale per le Linee Guida del 2011 "Come produrre, diffondere e aggiornare linee guida per la salute pubblica" (NIIEBP, 2011).

Sono state riportate 12 raccomandazioni, suddivise per grandi tematiche.

- La Raccomandazione 1 riguarda l'uso della Farmacopea in assenza di norme specifiche, per il monitoraggio e il controllo delle acque utilizzate nel settore dei dispositivi medici.
- La Raccomandazione 2 è riferita all'acqua in ingresso all'azienda: infatti, nonostante la maggior parte delle aziende utilizzino acqua potabile, una percentuale minore usa acque superficiali o sotterranee che devono essere trattate prima del loro utilizzo.
- Le Raccomandazioni 3, 4 e 5 riguardano il campionamento per le analisi microbiologiche: questo si può considerare una fase cruciale di tutto il sistema di analisi e le raccomandazioni potrebbero portare ad una omogeneità nella pratica.
- Le Raccomandazioni 6, 7, 8, 9 e 10 sono rivolte al sistema di analisi degli indicatori microbiologici e i risultati dello studio danno informazioni sul loro eventuale inserimento nel monitoraggio di routine.
- La Raccomandazione 11 riguarda il monitoraggio: nonostante la sua cadenza è dettata dalle necessità delle aziende, è utile programmare per il parametro *Pseudomonas* spp. una cadenza di almeno 15 giorni per poter prevenire e gestire l'eventuale formazione di biofilm e ridurre i rischi di un potenziale scadimento della risorsa.
- La Raccomandazione 12 tratta il tema dei tempi di sanificazione dell'impianto ed è strettamente connessa alla Raccomandazione 11 poiché ogni gestore deve cogliere, nei risultati del monitoraggio, gli eventuali segnali di allerta e quindi procedere a una sanificazione dell'impianto.

La linea guida è pubblicata dal Ministero della Salute sul suo portale (Mancini *et al.* 2015)

La metodologia tracciata, il coinvolgimento di personale tecnico e di portatori di interessi e la realizzazione dei prodotti, permette di avere un punto di partenza per improntare eventuali ulteriori studi su tematiche simili. Inoltre, si riportano alcuni approfondimenti correlati nella sezione dedicata del presente rapporto.

Bibliografia

- D'Ugo E, Marcheggiani S, D'Angelo A M, Caciolli S, Puccinelli C, Giuseppetti R, Marcoaldi R, Romanelli C, Mancini L. Microbiological water quality in the medical device industry in Italy. *Microchem J* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.012>.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Family I. Pseudomonadaceae. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer; 2005. p. 323.
- Health Canada. *Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines – 2009, Version 2 (GUI-0001)*. Ottawa: Health Canada; 2011. Disponibile all'indirizzo: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/compli-conform/gmp-bpf/docs/gui-0001-eng.php>; ultima consultazione 27/02/2017.
- Italia, 2010. Decreto Ministro della Salute 16.03.2010. *Gazzetta Ufficiale* n. 77 del 2/4/2010.

- Italia. Decreto Legislativo n. 31 – 2 febbraio 2001. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta Ufficiale n. 52 del 3/3/2001.
- Italia. Decreto Ministro della Salute 03.12.2008. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 304 del 31/12/2008.
- Mancini L, Romanelli C, Marcheggiani S, Grasso C, *et al.* *Linea guida italiana sugli aspetti microbiologici delle acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici*. Roma: Ministero della Salute; Istituto Superiore di Sanità; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2421_allegato.pdf; ultima consultazione 01/02/2017).
- Marcheggiani S, Romanelli C, D'Angelo AM, Pierdominici E, Cacioli S, Puccinelli C, Giuseppetti R, D'Ugo E, Volpi E, Volpi F, Figliomeni M, Mancini L. First Italian guidelines to ensure the microbiological safety of water used in the medical device industry - An operational tool. *Microchemical Journal* 2016; <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.011>.
- NIIeBP (Sistema nazionale per le linee guida Network Italiano Evidence based Prevention). *Come produrre, diffondere e aggiornare linee guida per la salute pubblica. Manuale metodologico - Sistema nazionale per le linee guida (ISS-SNLG)*. Roma: Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità; 2011.
- Palleroni NJ. Genus I. Pseudomonas. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer; 2005. p. 323-79.
- Popoff MY, Le Minor LE. Genus XXXIII. Salmonella. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer; 2005. p. 764-99
- Popoff MY, Le Minor LE; WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. *Formules antigéniques des sérovars de Salmonella*. 8th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella; 2001.
- Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. Escherichia. In: Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer; 2009. p. 607-24.
- Schleifer KH, Bell JA. Genus I. Staphylococcus. Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer; 2009. p. 392-421.
- Švec P, Devriese L. Genus I. Enterococcus. In: Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer; 2009. p. 594-607.
- UNI EN ISO 19458:2006. *Qualità dell'acqua - Campionamento per analisi microbiologiche*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2006.
- UNI EN ISO 5667-1:2007. *Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2007.
- UNI EN ISO 5667-3:1998. *Qualità dell'acqua - Campionamento - Guida per la conservazione e il maneggiamento di campioni*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 1998.
- UNI EN ISO 5667-3:2004. *Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 3: Guida per la conservazione e il maneggiamento di campioni d'acqua*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2004.

Allegati al capitolo

A1. Questionario informativo

Data compilazione:

Codice identificativo della Ditta (Codice ID):

DATI DITTA		
1	Ragione sociale	
2	Regione (della sede legale)	
3	Numero di dipendenti	
4	Fabbricante o terzista	
5	Possiede un sistema di qualità certificato	
6	Applica le GMP	
7	Mercato di riferimento (europea, nazionale, extra europeo)	
PRODOTTI		
8	Dispositivi medici	
9	Se realizza dispositivi medici quale tipologia	
10	Cosmetici	
11	Integratori	
12	Farmaci	
13	Biocidi	
14	Altra tipologia	
	NOTE	
STRUTTURA		
15	Gli ambienti di produzione (lavaggio, preparazione, confezionamento, ecc.) sono a contaminazione controllata	
16	Se si, sono validati	
17	Se si, in che classe sono	
	NOTE	
PRODUZIONE		
18	Viene utilizzata l'acqua per il processo produttivo/prodotto	
19	In quali fasi del processo viene utilizzata l'acqua (lavaggio componenti, miscelazione, sterilizzazione, ecc.)	
20	Che tipo di acqua viene utilizzata (potabile, non potabile di rete, di pozzo, ecc.)	
21	Che tipo di trattamento viene svolto	
22	Quali controlli vengono effettuati	
23	La periodicità dei controlli	
24	I controlli sono svolti internamente o esternamente	
25	Se svolti esternamente, sono effettuati da un laboratorio accreditato	
	NOTE	
LABORATORIO		
26	Internamente è presente un laboratorio microbiologico o chimico-fisico	
27	L'acqua utilizzata in laboratorio è la stessa che viene usata in produzione	
28	La ditta utilizza un solo impianto o due impianti separati	
	NOTE	

RICICLO		
29	Cosa viene fatto con l'acqua di scarto	
30	Viene venduta acqua di derivazione industriale	
	NOTE	
FORMAZIONE		
31	Nella formazione dei dipendenti la ditta include corsi relativi all'acqua e alle sue possibili contaminazioni microbiologiche	
32	Se si quali sono stati gli argomenti dei corsi	
33	La periodicità dell'aggiornamento della formazione relativamente a questo aspetto	
	NOTE	
MANUTENZIONE		
34	La manutenzione dell'impianto da chi viene fatta	
35	La periodicità delle attività di manutenzione	
36	Cosa si intende per manutenzione ordinaria	
37	Cosa si intende per manutenzione straordinaria	
38	La pulizia da chi viene svolta e con quali modalità e periodicità	
	NOTE	
VERIFICHE ISPETTIVE		
39	Durante le VII viene controllato anche l'impianto di purificazione dell'acqua	
40	Se si, quali aspetti vengono controllati	
41	Quale risulta l'incidenza delle non conformità sull'impianto dell'acqua negli ultimi 5 anni	
	NOTE	
EVENTI AVVERSI		
42	Si sono riscontrati problemi con il ciclo dell'acqua e con l'impianto di purificazione	
43	Se si, che tipo di problemi	
44	La Ditta quale tipo di risoluzione ha applicato	
	NOTE	

A2. Schemi dei protocolli utilizzati per la determinazione dei microrganismi

A2.1. Protocollo di lavoro per la determinazione della Conta Batterica Totale a 22°C e 37°C da acque ad uso industriale

Scopo: Rilevamento di Colonie Totali (CBT)

METODO DI ANALISI

Principio del metodo

L'isolamento ottimale di Colonie Totali (Conta Batterica Totale, CBT) si ottiene con il metodo di Inclusione

Bibliografia di riferimento

UNI EN ISO 6222. Qualità dell'acqua - Valutazione quantitativa dei microrganismi vitali. Conteggio delle colonie per inoculo su terreno agarizzato. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001

Allen M, Edberg S, Reasoner D. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria – What is their significance in drinking water? In: Proceedings of the NFS International/WHO Symposium on Bacteria in drinking water. Public health implications? Geneva, 24-27 April 2002. Geneva: WHO; 2003. p. 29-33

Quantità di campione da analizzare:

1 mL

Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

Plate Count Agar (PCA)

22 ± 1°C per 64 - 72 ore e 37 ± 1°C per 40 - 48 ore

L'incubazione a 22± 1°C per acque molto pulite fino 120 144 ore.

Espressione dei risultati:

Dopo l'incubazione contare tutte le colonie, per ciascuna temperatura, con un sistema di ingrandimento su sfondo scuro e scartare quelle a crescita confluyente.

N/ mL

A2.2. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Pseudomonas aeruginosa* da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di *Pse. aeruginosa*

Metodo di analisi:

Principio del metodo: L'isolamento ottimale di *Pse. aeruginosa* si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF)

ISO 16266:2006. Water quality -- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* -- Method by membrane filtration

Quantità di campione da analizzare:

250mL

Fase di filtrazione - 250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.

Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

CN agar

42° ± 1°C per 48 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.

Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione nerastra, tenendo conto della suddivisione delle colonie nere con e senza alone.

UFC/mL

Prove di conferma

Ossidasi secondo i metodi classici.

Conservazione dei campioni

Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)

A2.3. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Staphylococcus aureus* da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di *S. aureus*

Metodo di analisi:

Principio del metodo: L'isolamento ottimale di *S. aureus* si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF)

United States Environmental Protection Agency (EPA): EPA Method 1600: membrane filter test method for enterococci in water. 2002. EPA-821-R-02-022

Quantità di campione da analizzare:

250mL

è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare

Fase di filtrazione - 250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.

Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

Agar Baird Parker (BP Agar)

37 ± 1°C per 48 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.

Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione nerastra, tenendo conto della suddivisione delle colonie nere con e senza alone.

UFC/mL

Prove di conferma

Coagulasi e Catalasi secondo i metodi classici.

Conservazione dei campioni

Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)

A2.4. Protocollo di lavoro per la determinazione di Enterococchi intestinali da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di Enterococchi intestinali
<p>Metodo di analisi: Principio del metodo: L'isolamento ottimale di Enterococchi si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF)</p> <p>UNI EN ISO 7899-2 – 2003 Ricerca ed enumerazione di <i>Enterococchi intestinali</i> - Metodo di Filtrazione su membrana. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed . Washington, DC: APHA; 2005</p> <p>Quantità di campione da analizzare: <div style="text-align: center;">100 mL</div> è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare</p>
<p>Fase di filtrazione - 100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.</p>
<p>Fase di isolamento. Semina terreno selettivo</p> <p style="text-align: center;">Slanetz e Bartley (SB)</p> <p style="text-align: center;">37 ± 1°C per 44 ± 4 ore</p> <p>Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.</p>
<p>Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione blu-verde, sono contate ed i risultati espressi in "Unità Formanti Colonie" in 100 mL</p> <p style="text-align: center;">UFC/100 mL</p> <p>La colorazione rosso-scuro è dovuta alla riduzione del 2,3,5 Triphenyl,Tetrazolium Chloride.</p>
<p>Prove di conferma</p> <p>Idrolisi dell'Esculina con il metodo classico o utilizzando Test biochimici miniaturizzati API 20 NE</p>
<p>Conservazione dei campioni</p> <p>Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)</p>

A2.5. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Escherichia coli* da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di <i>E. coli</i>
Metodo di analisi: Principio del metodo: L'isolamento ottimale di <i>E. coli</i> si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF) UNI EN ISO 9308-1 – 2002 Ricerca ed enumerazione di <i>E. coli</i> e batteri coliformi .Metodo di Filtrazione su membrana. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed ,.Washington, DC: APHA; 2005 Quantità di campione da analizzare: <p style="text-align: center;">100 mL</p> è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare
Fase di filtrazione - 100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.
Fase di isolamento. Semina terreno selettivo <p style="text-align: center;">Tryptone, Bile salts, agar, X-Glu (TBX)</p> <p style="text-align: center;">44 ± 1°C per 18 ÷ 24 ore</p> Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.
Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione blu-verde, sono contate ed i risultati espressi in "Unità Formanti Colonie" in 100 mL <p style="text-align: center;">UFC/100mL</p> La colorazione delle colonie è dovuta alla capacità enzimatica di <i>E. coli</i> , avviene una reazione idrolitica ad opera dell'enzima β-glucuronidasi e del cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D glucuronide (X-Gluc) presente nel terreno.
Prove di conferma Verifica della citocromo ossidasi e produzione di indolo con i metodi classici o utilizzando Test biochimici miniaturizzati API 20E
Conservazione dei campioni Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)

A2.6. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Salmonella* spp. da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di <i>Salmonella</i> spp
<p>Metodo di analisi: Principio del metodo: L'isolamento ottimale di <i>Salmonella</i> si ottiene con un pre arricchimento seguito da un arricchimento e semina su terreno selettivo. EN ISO 6579 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp. Rev Edition: 2007-11-01. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on <i>Salmonella</i>. Michel Y. Popoff and Léon Le Minor Formules Antigeniques des Serovars de <i>Salmonella</i>. Geneve; WHO; 2001 American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed ,.Washington, DC: APHA; 2005 Quantità di campione da analizzare: 1L è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare</p>
<p>Fase di pre –arricchimento -rivitalizzazione dei microrganismi in un idoneo brodo di coltura non selettivo.</p> <p style="text-align: center;">Acqua peptonata $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 16÷22 ore</p>
<p>Fase Arricchimento</p> <p style="text-align: center;">Rappaport Vassiliadis brodo $42 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18÷24 ore</p>
<p>Fase di isolamento. Semina terreno selettivo</p> <p style="text-align: center;">McConkey . $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18 ÷ 24 ore</p>
<p>Prove di conferma</p> <p>Colonie tipiche colonie non tipiche Sottoporre a conferma almeno 1 colonia sospetta per piastra. Ripassare su Nutrient Agar. Eseguire il test della galattosidasi , indolo e il test VP. La conferma sierologica per la determinazione degli antigeni di <i>Salmonella</i> con il test di agglutinazione su vetrino.</p>
<p>Espressione dei risultati:</p> <p style="text-align: center;">ufc/ml</p>
<p>Conservazione dei campioni Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)</p>

IL BIOFILM: LA VITA SOCIALE DEI BATTERI COME PROBLEMA TECNOLOGICO

Marco Faimali (a), Giovanni Pavanello (a, b), Raffaella Cardente (c), Franco Baroncelli (c)

(a) *Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Genova*

(b) *ALVIM srl, Genova*

(c) *ECOTOX LDS srl, Cornaredo (MI)*

Introduzione

Esiste, distribuita in tutto il pianeta, una sottilissima pellicola nella quale vivono e si riproducono microrganismi organizzati in una vera e propria comunità che ricopre qualsiasi superficie in contatto con l'acqua. Questa "pellicola vitale", conosciuta con il termine inglese "biofilm", è presente ovunque, in qualsiasi ambiente nel quale siano presenti anche solo tracce di acqua, e i microscopici organismi che ne sono alla base sono in grado di svilupparsi anche in condizioni ambientali estreme: basti pensare che tale forma di vita può essere rinvenuta dalle profondità abissali fino alle stazioni spaziali.

Il biofilm è dappertutto, attorno a noi e anche dentro di noi. Se sorridiamo e passiamo un dito sui denti, avvertendo quella sensazione di viscido-umido, siamo entrati in contatto diretto con questo film microbico che, faticosamente, tentiamo di mantenere sotto controllo ogni giorno.

Il biofilm può essere definito come una matrice organica, formata da biopolimeri poco solubili in acqua, nella quale vivono e si riproducono in equilibrio dinamico i microrganismi che la formano, organizzati in un vero e proprio micro-ecosistema.

Ogni superficie in contatto costante con l'acqua viene quindi immediatamente e irrimediabilmente ricoperta da uno strato di biofilm (spesso da pochi millesimi a qualche decimo di millimetro), che rappresenta la prima fase della colonizzazione biologica. Esistono biofilm batterici prevalentemente monospecifici (ne sono un esempio quelli rinvenuti in cateteri e apparati ospedalieri), e altri in cui, all'interno di questo sottile strato gelatinoso, convivono e interagiscono anche altri organismi come protozoi, diatomee e funghi appartenenti a migliaia di specie differenti (come avviene, ad esempio, nei biofilm che crescono in ambienti naturali).

Dal punto di vista biologico, questa architettura a matrice semi-solida rappresenta un arrangiamento spaziale ottimale per la circolazione di nutrienti e la protezione degli organismi che la abitano.

Alla luce di tutto questo il biofilm può essere considerato, da una parte, come un ben strutturato sistema biologico il cui ruolo, nei sistemi ecologici, è ancora sottostimato e necessita maggiori approfondimenti, e, dall'altra, come uno strato di acqua disomogeneo mantenuto ancorato alla superficie solida dalla matrice esopolimerica con una "chimica" diversa, in grado di generare fenomeni estremamente dannosi in ambito tecnologico, con elevate ricadute economiche. Se il biofilm è il fenomeno biologico, il biofouling o microfouling non è altro che la diretta conseguenza della sua interferenza con le attività tecnologiche umane. Il vocabolo deriva dalla terminologia utilizzata nel settore industriale, dove fouling generalmente indica un deposito indesiderato di materiale sulle superfici di origine minerale, organica o, come nel nostro caso, biologica, in grado di innescare fenomeni di biocorrosione e di biodegradazione che possono danneggiare seriamente qualsiasi materiale metallico. Gli effetti negativi della formazione del biofilm possono interessare molteplici attività industriali che utilizzano l'acqua

come fluido di processo, dalle industrie alimentari a quelle farmaceutiche, dalle cartiere alle acciaierie. Per evitare ciò vengono utilizzate per il trattamento dell'acqua grandi quantità di sostanze chimiche tossiche (biocidi), che creano un forte impatto sull'ambiente nel quale vengono scaricate.

Il biofilm come fenomeno biologico

Generalmente, nell'ambiente naturale, i microrganismi tendono a non rimanere singole cellule isolate, ma ad organizzarsi in vere e proprie comunità (film, flocculati e fanghi biologici) distribuendosi in maniera ubiquitaria sia in ambiente terrestre che acquatico. Questi aggregati crescono e si sviluppano colonizzando qualsiasi superficie a disposizione, sia naturale che artificiale, adattandosi a condizioni ambientali anche estreme. Il termine biofilm viene quindi comunemente utilizzato per indicare tutti questi tipi di associazione microbica a prescindere dalla strutturazione biologica e dall'ambiente in cui esse si formano. Il concetto moderno di biofilm, accettato e ampiamente utilizzato da ecologi, biologi, microbiologi e ingegneri in tutto il mondo è stato introdotto da Costerton *et al.* (1987). Il biofilm marino può essere definito come una matrice organica, formata da biopolimeri poco solubili in acqua, nella quale vivono e si riproducono organismi che si succedono nel tempo ed entrano in competizione fino a stabilire, in equilibrio dinamico, uno strato biologico che ricopre la superficie. Ogni materiale immerso in mare viene quindi immediatamente e irrimediabilmente ricoperto da un sottile strato di biofilm, che rappresenta la prima fase della colonizzazione biologica. Questo fenomeno è stato osservato in tutti gli ambienti marini compresi quelli polari (Ford *et al.*, 1989; Maki *et al.*, 1990) e tropicali (Hoffmann *et al.*, 1978).

I meccanismi di formazione del biofilm, la struttura e la sua composizione specifica dipendono anche dalle caratteristiche di superficie del substrato (Taylor *et al.*, 1994).

Il modello di sviluppo del biofilm in ambiente acquatico prevede varie fasi (adesione, colonizzazione, accumulazione, e dispersione) modulate temporalmente da un range di fattori biologici, fisico-chimici e ambientali.

Hamilton e Characklis (1989) descrissero le fasi fondamentali dello sviluppo del biofilm:

1. Trasporto di molecole organiche e cellule sulla superficie.
2. Assorbimento delle molecole organiche (condizionamento della superficie).
3. Adesione delle cellule sulla superficie condizionata.
4. Crescita delle cellule e aumento della produzione di sostanze polimeriche extracellulari (*Extra Polymeric Substance*, EPS).

La capacità di attecchimento su una superficie è chiamata *sticking efficiency* e dipende da molti fattori tra i quali, in particolare, le proprietà della superficie, lo stato fisiologico dei microrganismi e le condizioni idrodinamiche dell'ambiente in corrispondenza della superficie.

La successiva duplicazione cellulare e la produzione di EPS consentono la colonizzazione del substrato e aumentano la successiva adesione cellulare (accumulo) fino al raggiungimento di una condizione di stabilità strutturale.

Gli EPS, spesso denominati anche glicocalice, rappresentano l'insieme delle differenti classi di macromolecole (polisaccaridi, proteine, acidi nucleici e fosfolipidi) evidenziate negli spazi intercellulari degli aggregati microbici. Queste molecole sono responsabili delle forze coesive che permettono alla matrice del biofilm la tipica architettura tridimensionale dentro la quale i microrganismi si sviluppano (Wingender *et al.*, 1999). L'EPS crea quindi il microambiente essenziale per lo sviluppo e la crescita delle cellule sessili ed è il maggior responsabile dell'integrità funzionale e strutturale del biofilm definendo, oltre a quelle biologiche, anche le sue proprietà fisico-chimiche. In generale il 60-90% della materia organica di un biofilm risulta

essere costituita proprio dalle sostanze polimeriche extracellulari (Nielsen *et al.*, 1997). In ambiente acquatico i batteri con la capacità di generare EPS abbondano, e meno dell'1% sono presenti in forma planctonica. Sono molti gli eventi, mediati dalla presenza degli EPS, che contribuiscono alla selezione preferenziale di questi microrganismi acquatici (Morton *et al.*, 1998):

- Le sostanze polimeriche mediano il processo di adesione cellulare.
- I nutrienti organici e inorganici sono concentrati nell'interfaccia solido-liquido.
- Il glicocalice funziona come una matrice a scambio ionico che trasporta i nutrienti all'interno verso le cellule.
- Il glicocalice conserva e concentra gli enzimi digestivi rilasciati dai microrganismi incrementando l'efficienza metabolica delle cellule.
- Il glicocalice costituisce una barriera fisica che assicura una parziale protezione da eventuali sostanze antibatteriche.

La capacità di produrre EPS non è esclusiva degli organismi procarioti (batteri, archea) ma è stata evidenziata anche in numerosi eucarioti (alghe e funghi).

La crescita e l'accumulo di biofilm all'interfaccia solido-liquido è un evento che, una volta innescato, procede in modo quasi logaritmico, fino al raggiungimento dell'equilibrio, seguendo una tipica curva di crescita di popolazione, la curva "k". Questa curva sigmoidale individua tre fasi (Charaklis, 1990), chiamate:

- a) fase di induzione;
- b) fase di crescita esponenziale, che prosegue fino a raggiungere una composizione e una struttura finale stabile e costante all'interno di oscillazioni regolari della fase definitiva di "plateau" (fase pseudostazionaria);
- c) fase pseudostazionaria.

Dopo poco tempo (minuti-ore) di immersione di una superficie in acqua di mare, quindi, i microrganismi pionieri (principalmente batteri) del biofilm hanno già cominciato la colonizzazione della superficie. Tuttavia bisogna attendere da qualche giorno a qualche settimana (in rapporto alla stagione e all'ambiente di immersione) perché aumenti la biodiversità specifica e lo strato di biofilm divenga già apprezzabile visivamente. Un biofilm maturo contiene una popolazione mista di organismi che possono organizzarsi in strutture estremamente eterogenee, denominate spesso consorzi microbici, entità dinamiche che vengono strutturalmente rimodellate da forze idrodinamiche e dall'attività di grazing dei protozoi (Keevil & Walker, 1992; Costerton *et al.*, 1995).

Dal punto di vista biologico, questa architettura permette la microcircolazione di fluidi interstiziali tra gli spazi vuoti presenti (microcanali) e rappresenta un ottimale arrangiamento spaziale per la circolazione di nutrienti, anche all'interno degli strati più profondi del biofilm. La formazione del biofilm genera, solitamente, le condizioni favorevoli per l'insediamento del macrofouling, che continua così il processo di colonizzazione della superficie.

Alla luce di tutto questo, il biofilm può essere considerato, da una parte, come uno strato di acqua disomogeneo con una "chimica" diversa da quella del corpo idrico, mantenuta ancorata alla superficie solida dalla rete degli EPS, in grado di generare situazioni potenzialmente dannose in ambito tecnologico e, dall'altra, come un ben strutturato sistema biologico il cui ruolo, nei sistemi ecologici, è ancora sottostimato e necessita di maggiori approfondimenti.

Il biofilm come problema tecnologico

Quando lo sviluppo del biofilm e dei suoi microrganismi interessa materiali utilizzati in qualsiasi apparato prodotto dall'uomo, può creare seri problemi tecnologici ad ampio spettro,

spesso con elevate ricadute economiche. Se il biofilm è il problema, il biofouling o microfouling non è altro che la diretta conseguenza della sua interferenza con le attività tecnologiche umane. Il vocabolo biofouling deriva dalla terminologia utilizzata nel campo delle tecnologie dedicate agli scambiatori termici, dove il termine “fouling” generalmente indica un deposito indesiderato di materiale sulle superfici che può essere di origine minerale, organica o, come nel nostro caso, di origine biologica. Gli effetti negativi della formazione del biofouling possono interessare molteplici attività umane, riassunte in maniera schematica in Tabella 1 nella quale sono elencati gli effetti e i riferimenti bibliografici di base (da Morton *et al.*, 1998).

Tabella 1. Esempi di alcuni effetti dannosi del biofilm

Presenza di biofilm	Problema/Effetto	Riferimento
Sulle carene delle navi	Aumento delle spese di carburante	Dempsey, 1981a; 1981b.
Sistemi fluidi di raffreddamento	Perdita di energia e danni all'impianto, ridotta capacità di scambio termico	Brankevich <i>et al.</i> , 1990.
Sensori marini	Diminuzione delle performance e deterioramento	Kerr <i>et al.</i> , 1998.
Industrie di recupero degli idrocarburi	Corrosione causata da batteri solforiduttori e ostruzione delle condotte	Lynch & Edyvean, 1988.
Industrie alimentari, di pitture e cartiere	Deterioramento e diminuzione della qualità dei prodotti	Holah <i>et al.</i> , 1994; Eastwood, 1994; Väisänen <i>et al.</i> , 1994.
Impianti di distribuzione dell'acqua	Problemi organolettici, crescita e contaminazione da parte di potenziali agenti patogeni, diminuzione della capacità portante dei condotti, corrosione microbiologica.	LeChevallier <i>et al.</i> , 1988a, 1988b; van der Wende <i>et al.</i> , 1989; Walker <i>et al.</i> , 1991.
Formazione su dispositivi medici e protesi	Resistenza a trattamenti antimicrobici e aumento del rischio di infezioni secondarie	Reid e Busscher, 1993.
Adesione sui denti	Formazione di carie e placca	Marsh <i>et al.</i> , 1993.

La presenza del biofilm sulle carene delle imbarcazioni può determinare una riduzione della velocità di navigazione degli scafi con conseguente aumento dei costi di carburante. L'efficienza degli scambiatori di calore degli impianti che utilizzano l'acqua come raffreddamento può essere seriamente compromessa dalla presenza del biofilm, che isola la superficie metallica dalla fase acquosa (Characklis, 1990; Satpathy, 1999) limitando il trasporto convettivo del calore e aumentando i costi energetici per la corretta circolazione dell'acqua.

Il biofilm batterico, la più importante componente del (micro) biofouling, rappresenta un grave problema anche negli impianti industriali in cui l'acqua costituisce un elemento di processo.

Ad esempio in un sistema di scambio termico, una delle più importanti componenti di qualsiasi centrale energetica, un biofilm spesso 20 micron può causare una diminuzione del 30% dell'efficienza termica: il biofilm, infatti, è fino a quattro volte più isolante dei depositi di CaCO₃. Il biofilm può contribuire all'aumento del fouling inorganico, producendo sostanze collose che incrementano l'adesione delle particelle, inoltre apre la strada all'insediamento di organismi di maggiori dimensioni, il cosiddetto macrofouling, il quale può ridurre il flusso d'acqua (incrementando, di conseguenza, il consumo di energia, per poter compensare la riduzione di diametro delle tubazioni).

Questi problemi possono portare fino al blocco delle pipeline e al fermo impianto. In queste ultime decadi diversi gruppi di ricerca, che studiano il ruolo del biofilm durante i processi di corrosione, hanno messo in luce molti dei meccanismi con i quali i microrganismi modificano la cinetica dei processi corrosivi dei materiali metallici alterandone le proprietà chimiche della superficie (Beech, 1999; Beech & Gaylarde, 1999; Geesey & Suci, 2000). La corrosione microbiologicamente influenzata (Microbial Influenced Corrosion) è rafforzata dalla presenza degli EPS, che limitano gli scambi dei composti chimici tra l'acqua e i materiali, modificando i meccanismi e le velocità di svolgimento dei processi di biocorrosione e di biodegradazione delle superfici sottostanti. Il biofilm causa ogni anno negli impianti industriali di tutto il mondo danni per miliardi di euro.

Gli ambienti adatti alla colonizzazione e alla formazione di biofilm sono praticamente illimitati, e comprendono anche i dispositivi medici: valvole cardiache, cateteri venosi, cateteri urinari (di Foley), lenti a contatto, dispositivi intrauterini (Tabella 2).

Tabella 2. Il biofilm come problema tecnologico per strumenti e presidi medici

Dispositivi	Biofilm (specie batterica principale)
Lenti a contatto	Cocchi gram-positivi e <i>P. aeruginosa</i>
Dispositivi per dialisi	Flora batterica e fungina mista
Cateteri urinari	<i>E. coli</i> e altri bacilli gram-negativi
Dispositivi endotracheali	Flora batterica e fungina mista
Cateteri venosi	<i>S. epidermidis</i>
Valvole cardiache meccaniche	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Inneschi vascolari	Cocchi Gram-positivi
Dispositivi ortopedici	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Protesi di vari organi	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>

I *National Institutes of Health* (NIH) statunitensi hanno stimato come oltre l'80% delle malattie infettive umane siano correlabili al biofilm.

Il biofilm svolge un ruolo di primaria importanza nel promuovere la colonizzazione delle superfici di corpi estranei, come protesi o cateteri vascolari e urinari, proteggendo i microrganismi dall'azione degli antibiotici, generando una resistenza fenotipica a molte classi di farmaci, tra cui principalmente aminoglicosidi, beta-lattamici, fluorochinoloni e glicopeptidi (Donlan & Costerton, 2002).

Strategie di controllo del biofilm

Indipendentemente dagli scenari industriali e tecnologici l'uomo ha adottato da sempre delle strategie di sanificazione che comprendono una serie di interventi di disinfezione fisica e/o chimica sia dei batteri presenti in forma planctonica che di quelli organizzati in biofilm, nel tentativo di ridurre al minimo la contaminazione microbiologica.

I trattamenti basati su un approccio fisico includono principalmente sanificazione con shock termici, trattamento con raggi ultravioletti, radiazioni ionizzanti e ultrafiltrazione. L'approccio chimico prevede, invece, l'uso di biocidi non ossidanti (chetoni, guanidine, tiocarbammati, aldeidi, amidi, amine, tiocianati, ecc.), agenti ossidanti (cloro, bromo, clorammine, ozono, H₂O₂, ecc.) e ioni metallici (rame, argento). Per un approfondimento sulle strategie di controllo del

biofilm, sia classiche che emergenti, si consigliano alcune recenti *review* dedicate a questa tematica (Simões *et al.*, 2010; Srey *et al.*, 2013).

L'efficacia di qualunque tecnica di trattamento anti-biofilm è generalmente influenzata dalla prima fase di sviluppo del ricoprimento biologico, che dipende da molti fattori ambientali (temperatura, stagionalità, pH, composizione chimica dell'acqua, ossigeno disciolto, ecc.).

Di fatto, quando la matrice EPS del biofilm inizia a svilupparsi, la resistenza del biofilm agli agenti esterni può aumentare di tre ordini di grandezza. Ciò significa che, quando viene applicato un trattamento di pulizia (ad es. un trattamento chimico), se il biofilm è nella sua fase iniziale di sviluppo le probabilità di successo sono maggiori rispetto ad un biofilm maturo. Nel primo caso, dopo il trattamento di pulizia il biofilm avrà bisogno di più tempo per tornare a crescere, mentre nel secondo caso, poiché saranno presenti batteri ancora vivi, ricrescerà velocemente.

Tutte queste considerazioni giustificano il grande interesse nei confronti di tecnologie innovative e sensori capaci di rilevare in tempo reale la presenza di batteri planctonici e di biofilm all'interno di linee d'acqua industriali.

Metodologie per il rilevamento del biofilm

Riuscire a monitorare in tempo reale lo sviluppo del biofilm è una delle innovazioni tecnologiche in grado di ottimizzare in modo significativo l'efficacia dei sistemi di trattamento in numerosi ambiti industriali. Lo sviluppo di nuove metodologie in grado di dare informazioni in tempo reale sulla contaminazione microbiologica dell'acqua (microrganismi planctonici) e delle superfici (microrganismi del biofilm) sono state oggetto di notevole interesse in questo settore negli ultimi anni (Faimali *et al.*, 2010; Pavanello *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2013).

Tra le tecniche di misura del biofilm “non in linea” (*ex situ*), una delle più recenti è il kit Hydrobio® della BKG Water solution, che prevede l'immersione di un coupon all'interno del circuito idraulico per un periodo di tempo predefinito, quindi la sua estrazione e colorazione con la soluzione fornita nel kit. Confrontando il colore ottenuto con la scala di riferimento, è possibile quantificare (in g/m²) la quantità di biofilm presente sul coupon.

Le tecniche di misura del biofilm “in linea” (*in situ*), includono sistemi basati su diversi principi chimici, fisici e ottici. Tra i dispositivi più sensibili, vi sono sicuramente quelli basati su tecniche elettrochimiche, che misurano cioè l'alterazione causata dal biofilm nel comportamento di una superficie metallica per quanto riguarda il passaggio di cariche elettriche. I sistemi più noti, all'interno di questa categoria, sono il BioGEORGE (Licina & Nekoska, 1993) e il BIOX (Cristiani & Mollica, 1998). Entrambi questi sistemi permettono di distinguere la crescita di biofilm dalla generica deposizione di fouling, ma presentano limitazioni funzionali e tecnologiche, che li rendono di difficile utilizzo in ambito applicativo.

Una seconda famiglia di sensori è rappresentata dai dispositivi basati su tecniche ottiche, limitata per lo più a prototipi di laboratorio. Tra i prodotti presenti sul mercato, uno dei più noti è l'OPTIQUAD della KROHNE Optosens GmbH (Strathmann *et al.*, 2013). Come tutti i dispositivi ottici, è particolarmente soggetto al problema dello sporco, che rende questo strumento utilizzabile solo in particolari condizioni. L'OPTIQUAD, inoltre, non è in grado di distinguere la crescita di biofilm dalla generica deposizione di fouling. Quest'ultimo problema si riscontra anche nei sensori basati sulla misura di altri parametri fisici (es. scambio termico, ultrasuoni, coefficiente di attrito). Tale limitazione rende questi sensori poco utili dal punto di vista dell'ottimizzazione e della verifica di trattamenti volti a contrastare la crescita del biofilm.

Sistemi di monitoraggio innovativi

In questo paragrafo verranno presentati alcuni innovativi sistemi di monitoraggio della presenza di batteri e di biofilm: il sistema DeltaTox® II, prodotto da Modern Water, uno strumento semplice, rapido, reattivo e portatile per valutare la concentrazione microbiologica di una matrice acquosa sino a 100 UFC/mL, il kit enzimatico QuickChek® SRB per la determinazione della presenza di batteri anaerobi solfato-riduttori (prodotti entrambi da Modern Water, rappresentata in Italia da ECOTOX LDS), e il biosensore ALVIM, sviluppato da una start-up dell'Istituto di Scienze Marine del CNR, in grado di misurare l'attività bioelettrochimica del biofilm e fornire in tempo reale una stima della sua crescita (sin dall'1% di ricoprimento) su qualsiasi superficie.

Lo strumento DeltaTox II utilizza i kit per ATP Luminultra di seconda generazione, formulati specificatamente per applicazioni diversificate (acque trattate, acque di raffreddamento, composti organici, acque reflue). L'ATP (adenosina trifosfato) è la principale molecola di trasporto dell'energia per ogni forma di vita e la misura di ATP è quindi un'indicazione diretta della presenza totale di microorganismi. L'ATP prodotto dai microorganismi viene miscelato con l'enzima luciferasi, per produrre una luminosità che viene misurata per mezzo del luminometro DeltaTox II. Ad un maggior numero di microorganismi corrisponde una maggiore quantità di ATP e, di conseguenza, una maggiore emissione luminosa. Con la misura di ATP si individua quindi la presenza di tutti i microorganismi viventi, e non solo di una frazione degli stessi, con un tempo di analisi di pochi minuti.

Un particolare problema, in ambito industriale, è rappresentato dai batteri anaerobi solfato-riduttori, ubiquitari in ambiente e comunemente presenti nelle acque di raffreddamento. Durante la loro crescita provocano le cosiddette "vaiolatura" (pitting), incrementano il rischio di corrosione di metalli e cementi, e producono acido solfidrico. Il Quick-Chek® SRB è un kit utilizzabile sia in campo che in laboratorio, ed è basato su anticorpi purificati per l'enzima adenosina-5'-fosfosulfonato (APS) reduttasi, comune a tutti i ceppi di SRB. I risultati semi-quantitativi, riferiti a tutti gli SRB, vitali e non vitali, si ottengono in pochi minuti, e il kit permette di analizzare contemporaneamente diversi campioni. L'eventuale presenza di prodotti chimici o salinità non cause interferenze nella misurazione effettuata tramite il kit (Modern Water, 2015).

I sistemi Deltatox ®II e Quick-Chek® SRB sono utilizzabili ove sia previsto un sistema di prelievo dei campioni da analizzare in laboratorio, mentre i sensori ALVIM per il rilevamento del biofilm possono essere installati in linea, direttamente sulle tubazioni di trasporto dell'acqua. Alla base del funzionamento della tecnologia ALVIM vi è la capacità del biofilm di generare un segnale bioelettrochimico (una sorta di corrente elettrica) direttamente correlato alla crescita dei batteri sulla superficie del sensore stesso (Pavanello *et al.*, 2011). Sfruttando questo fenomeno, i sensori ALVIM possono fornire, in tempo reale, un'indicazione accurata della crescita del biofilm all'interno di tubazioni e circuiti idraulici civili e industriali. Come hanno dimostrato diversi studi di laboratorio, sperimentazioni e installazioni in svariati ambiti industriali (food&beverage, acque di raffreddamento, dissalazione, cartiere), i sensori basati su questa tecnologia permettono di ottimizzare i trattamenti di pulizia, intervenendo non appena il biofilm inizia a crescere. Ciò consente di evitare sprechi e inutili immissioni di sostanze tossiche nell'ambiente acquatico, con un considerevole abbattimento dei costi economici e ambientali.

Questo nuovo approccio di monitoraggio biologico integrato ai sistemi di trattamento dell'acqua industriale si è dimostrato di fondamentale importanza per l'ottimizzazione di questi ultimi, contribuendo ad una significativa riduzione dei costi e dell'impatto ambientale del trattamento chimico. Ciò si rivela sempre più strategico, per tutti i soggetti coinvolti

nell'utilizzo e nella gestione delle acque industriali e civili, anche nell'ottica della *best practice* e della *green economy*.

Bibliografia

- Beech IB, Gaylarde C. Recent advances in the study of biocorrosion. An overview. *Rev Microbiol* 1999;30:177-90.
- Beech IB. Modern techniques for studying biofilms and their role in biodeterioration. In: *Proceedings 2nd International Congress in Environmental Microbiology*, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Santa Fe de Bogota, Colombia, 20-24 May 1999. p.17-24.
- Brankevich GJ, De Mele MLF, Videla HA. Biofouling and corrosion in coastal power plant cooling water systems. *MTS J* 1990;24:18-28
- Characklis WG. Microbial fouling and microbial fouling control. In: Characklis WG, Marshall KC (Ed.). *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons Inc.; 1990. p. 523-633.
- Costerton JW, Cheng KG, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 1987;41:453-464.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial Biofilms. *Ann Rev Microbiol* 1995;49:711-45.
- Cristiani P, Mollica A, Ventura G. On-line monitoring of biofilm and TRO by a new ENEL's system. *Proceedings of OCEANS '98*, Nice, France 1998; p. 1507-11.
- Dempsey MJ. Colonization of antifouling paints in marine bacteria. *Bot Mar* 1981b;24:185-91.
- Dempsey MJ. Marine bacterial fouling: a scanning electron microscope study. *Mar Biol* 1981a;61:305-15.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93.
- Eastwood IM. Problems associated with biocides and biofilms. In: Wimpenny J, Nichols WW, Stickier D, Lappin-Scott H (Ed.). *Bacterial biofilms and their control in medicine and industry*, *British Biofilms Club. Inaugural Meeting held at Gregynog Hall, Wales*. BioLine, Cardiff, 1994. p. 169-72.
- Faimali M, Chelossi E, Pavanello G, Benedetti A, Vandecandelaere I, De Vos P, Vandamme P, Mollica A. Electrochemical activity and bacterial diversity of natural marine biofilm in laboratory closed-systems. *Bioelectrochemistry* 2010;78:30-38.
- Fischer M, Wahl M, Friedrichs G. Design and field application of a uv-led based optical fiber biofilm sensor. *Biosens Bioelectron* 2012;33:172-8.
- Ford TE, Walch M, Mitchell R, Kaufman MJ, Vestal JR, Ditner SA, Lock MA. Microbial film formation on metal in an enriched Arctic river. *Biofouling* 1989;301-11.
- Geesey GG, Suci PA. Monitoring biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy. In: Evans LV (Ed.). *Biofilms: recent advances in their study and control*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 253-77.
- Hamilton WA, Characklis WG. Relative Activities of Cells in Suspension and in Biofilms. In: Characklis WG, Wilderer PA (Ed.). *Structure and function of biofilms*. New York: John Wiley & Sons; 1989. p. 298-320.
- Hoffmann DK, Neumann R, Henne K. Strobilation, budding, and initiation of scyphistoma morphogenesis in the rhizostome *Cassiopea andromeda* (Cnidaria: Scyphozoa). *Mar Biol* 1978;47:161-76.
- Holah JT, Bloomfield SF, Walker AJ, Spenceley H. Control of biofilms in the food industry. In: Wimpenny J, Nichols WW, Stickier D, Lappin-Scott H (Ed.). *Bacterial biofilms and their control in*

- medicine and industry, British Biofilms Club. Inaugural Meeting* held at Gregynog Hall, Wales, BioLine, Cardiff 1994; p. 163-8.
- Keevil CW, Walker J, Nomarski DIC. Microscopy and image analysis of biofilms. *Binary* 1992;4:93-5.
- Kerr MJ, Cowling CM, Beveridge MJ, Parr ACS, Head DM, Davemport J, Hodkiess T. The early states of marine biofouling and its effect on two types of optical sensors. *Envir Int* 1998;24:331-43.
- LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors affecting the survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol* 1988a;54:649-654.
- LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1988b;54:2492-2499.
- Licina GJ, Nekoska G. An electrochemical method for on-line monitoring of biofilm activity. *Proceedings of CORROSION/93*, Houston, Texas, 1993; Paper No. 403.
- Lynch JL, Edyvean RGJ. Biofouling in oilfield water systems: A review. *Biofouling* 1988;1:147-62.
- Maki JS, Rittschof D, Samuelsson MO, Szewzyk U, Yule AB, Kjelleberg S, Costlow JD, Mitchell R. Effect of marine bacteria and their exopolymers on the attachment of cypris larvae. *Bull Mar Sci* 1990;46:499-511.
- Marsh PD, Bradshaw DJ, Watson GK, Cummings D. Factors affecting the development and composition of defined mixed biofilms of oral bacteria. In: Wimpenny J, Nichols WW, Stickier D, Lappin-Scott H (Ed.). *Bacterial biofilms and their control in medicine and industry*, British Biofilms Club. Inaugural Meeting held at Gregynog Hall, Wales. BioLine, Cardiff, 1993:7-9.
- Morton LHG, Greenaway DLA, Gaylarde CC, Surman SB. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int Biodeter Biodegr* 1998;41:247-59.
- Nielsen PH, Jahn A, Palmgren R. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci Technol* 1997;36 (1):11-19.
- Pavanello G, Faimali M, Pittore M, Mollica A, Mollica A, Mollica A. Exploiting a new electrochemical sensor for biofilm monitoring and water treatment optimization. *Water Res* 2011;45:1651-8.
- Pires L, Sachsenheimer K, Kleintschek T, Waldbaur A, Schwartz T, Rapp BE. Online monitoring of biofilm growth and activity using a combined multi-channel impedimetric and amperometric sensor. *Biosens Bioelectron* 2013;47:157-63.
- Reid G, Busscher HJ. Importance of surface properties in bacterial adhesion to biomaterials, with particular reference to urinary tract. *Int Biodeter Biodegr* 1993;30:105-22.
- Satpathy KK. Effects of biofouling on the cooling water quality of a nuclear power plant. *Bull Electrochem* 1999;15:143-7.
- Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci Technol* 2010;43:573-583.
- Sokunrotanak S, Iqbal KJ, Sang-Do H. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 2013;3:572-85.
- Srey S, Jahid IK, Ha SD (2013) Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31:572-585
- Strathmann M, Mittenzwey KH, Sinn G, Papadakis W, Flemming HC. Simultaneous monitoring of biofilm growth, microbial activity, and inorganic deposits on surfaces with an in situ, online, real-time, non-destructive, optical sensor. *Biofouling* 2013;29:573-583.
- Taylor GT, Troy PJ, Sharma SK. Protein adsorption from seawater into solid substrata, I. Influence of substratum surface properties and protein concentration. *Oecologia* 1994;48:3-18.
- Váisänen GM, Nurmiaho-Lassila E, Marmo SA, Salkinoja-Salonen MS. Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:641-53.

- Van Der Wende E, Characklis WG, Smith D. Biofilms and drinking water quality. *Water Res* 1989;23:1313-22.
- Walker JT, Dowsett AB, Dennis PJJ, Keevil CW. Continuous culture studies of biofilms associated with copper corrosion. *Int Biodeterior* 1991;27:121-34.
- Wingender J, Neu T, Flemming HC. What are bacterial extracellular polymer substances? In: Wingender J, Neu T, Flemming HC (Ed.). *Bacterial extracellular polymer substances*. Heidelberg, Berlin: Springer; 1999. p. 1-19.

ASPETTI ECONOMICI NELLA GESTIONE DELLE RISORSE IDRICHE: LA VALUTAZIONE ECONOMICA DEGLI USI DELL'ACQUA

Stefano Fabiani (a), Riccardo Grifoni (b)

(a) *Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Politiche e Bioeconomia, Roma*

(b) *Servizi Pubblici Locali, Energia e Inquinamenti, Regione Toscana, Firenze*

Teoria economica e principi generali

L'economia è solitamente definita come la disciplina che studia le modalità di allocazione di risorse scarse tra usi alternativi. La scarsità delle risorse, ossia il fatto che esse siano disponibili in quantità limitata rispetto alla domanda, è condizione necessaria affinché si parli di risorse economiche. L'ambiente, e il capitale naturale in genere, in quanto finito, o comunque non riproducibile senza limiti, rappresenta una risorsa economica.

Come per qualsiasi altra risorsa, l'obiettivo è di garantirne un uso efficiente. Nell'economia tradizionale (economia neoclassica), il mercato è il meccanismo attraverso il quale si dovrebbe soddisfare tale finalità. Sfortunatamente, le condizioni affinché ciò avvenga sono particolarmente restrittive, soprattutto per quanto riguarda i beni ambientali. Lo studio delle economie reali ha, infatti, evidenziato come le ipotesi alla base di un mercato di concorrenza perfetta siano di rado realizzate e, generalmente, si verificano significative anomalie e imperfezioni. È da tali fallimenti di mercato che la teoria microeconomica standard deriva l'origine dei problemi di carattere ambientale e la necessità di sviluppare strumenti per porvi rimedio. Gli economisti hanno così definito alcune categorie economiche che rappresentano oggi la "cassetta degli strumenti" per tutti coloro che intendano affrontare questioni di carattere ambientale; quanto segue rappresenta una breve introduzione ad alcuni dei concetti fondamentali.

La teoria economica neoclassica, che si afferma dalla metà dell'800, costruisce un sistema teorico in cui la disponibilità di risorse naturali non viene messa in discussione e il prezzo rappresenta una misura della scarsità del bene.

Dal confronto tra la domanda dei fattori e loro offerta si determina la distribuzione di equilibrio e, contemporaneamente, la determinazione dei prezzi relativi dei prodotti in termini di equilibri di domanda e offerta. Tale impostazione permette, quindi, di determinare simultaneamente la quantità prodotta, la sua distribuzione tra i diversi fattori di produzione e i prezzi relativi delle merci.

Dal punto di vista ambientale, il modello neoclassico affermava che il sistema di mercato, che avrebbe dovuto assicurare l'ottima allocazione delle risorse, non funzionava perché, dato il sistema dei prezzi, certe risorse non erano considerate scarse ma, al contrario, inesauribili e non alterabili. Il problema, quindi, era di trovare dei meccanismi in grado di aiutare il mercato a riportare all'interno del sistema economico gli effetti esterni che esso generava.

È in quegli anni, infatti, che nasce l'economia ambientale, disciplina interna all'economia standard, della quale assume principi e vincoli teorici e metodologici, che affronta la questione dei fallimenti di mercato nel trattare il problema delle esternalità ambientali.

La prima fase di sviluppo dell'Economia Ambientale, quindi, è dedicata al reinserimento nella teoria dominante di alcuni correttivi, ritenuti idonei a soddisfare i problemi ambientali rilevanti dal punto di vista economico, e al miglioramento dei metodi di stima dei beni fuori mercato.

Negli ultimi anni si è così sviluppata una disciplina alternativa rispetto all'economia ambientale: l'economia ecologica (Boulding, 1966; Daly, 1977; Meadows, 1970; Kapp, 1963; Passet, 1979; Gowdy & Erickson, 2005). Questa, attraverso un approccio trans-disciplinare, tenta di individuare un nuovo paradigma in grado di coniugare, nel lungo periodo, ragioni ecologiche ed economiche, e fornire quindi un contenuto teorico e operativo al concetto di sviluppo sostenibile (Bresso, 1993). Per "sviluppo sostenibile" s'intende uno sviluppo che soddisfa le esigenze del presente senza compromettere la possibilità per le generazioni future di soddisfare i propri bisogni (WCED 'Commissione Brundtland' 1987).

Tale paradigma – ancora in fase di costruzione – si basa, fundamentalmente, su concetti ignorati, parzialmente o totalmente, dalla teoria standard, come quelli di "limite", "complessità" e "incertezza". Tale approccio supera la concezione meccanicistica dell'economia neoclassica, in cui i processi appaiono reversibili e circolari, e abbraccia il concetto di entropia, per il quale i processi riguardanti gli usi delle risorse naturali appaiono irreversibili.

Entrando più in dettaglio, l'approccio microeconomico ai problemi di carattere ambientale richiede l'introduzione di due concetti ampiamente analizzati nel campo dell'Economia Pubblica: i beni pubblici e le esternalità.

Com'è noto, dal punto di vista teorico, la distinzione tra beni pubblici e beni privati dipende dalle caratteristiche di "rivalità" nel consumo ed "escludibilità" dei beni. L'assenza di rivalità si ha in tutti quei casi in cui il consumo di un bene da parte di un soggetto non va a diminuire, o ad impedire, il consumo dello stesso bene da parte di un altro individuo. Date le sue caratteristiche fisiche, l'attività di fruizione di un bene non-rivale non comporta, infatti, la sua distruzione totale o parziale; la stessa unità di bene può essere quindi goduta da più consumatori contemporaneamente, senza alcuna riduzione della soddisfazione percepita da ciascun fruitore (si pensi, ad esempio, alla difesa nazionale).

I beni non-escludibili e non-rivali sono detti beni pubblici puri, mentre i beni che presentano entrambe le proprietà sono chiamati beni privati puri.

La non-rivalità e la non-escludibilità producono, per motivi diversi, rilevanti fallimenti del mercato.

Si parla di esternalità "ogniqualevolta un individuo (o un'impresa) compie una azione che ha effetti su un altro individuo (o su un'altra impresa) senza che quest'ultimo paghi o riceva un indennizzo per tali effetti" (Stiglitz, 2003, p. 220). Quando le azioni di alcuni hanno effetti negativi su altri soggetti si parla di esternalità negative; al contrario, qualora tali azioni producano dei benefici, si parlerà di esternalità positive. Ad esempio, generano delle esternalità positive l'effetto esercitato dalle attività agricole tradizionali sulla qualità del paesaggio, il maggiore valore immobiliare indotto dalla presenza di risorse storico-architettoniche, lo sviluppo locale indotto dalla presenza di attività produttive; al contrario, rappresentano esternalità negative le emissioni di fumi prodotti da attività industriali o dalle automobili, i danni ai beni ambientali dovuti ad un eccesso d'utenza, l'inquinamento idrico riconducibile all'uso in eccesso di fertilizzanti e pesticidi in agricoltura.

La presenza di esternalità, sia positive (economie esterne) che negative (diseconomie esterne), rende inadeguato il meccanismo di mercato, nel senso che le scelte degli individui sono effettuate sulla base di prezzi e di costi che non riflettono il valore effettivo dei beni prodotti e consumati.

Per quanto detto, dal punto di vista economico, l'acqua rappresenta un bene particolarmente complesso. A titolo esemplificativo si riportano alcune definizioni:

- Delbono e Lanzi (2005): la risorsa idrica è un bene economico e sociale avente natura di bene pubblico e globale (valutata la rilevanza planetaria della risorsa e del problema idrico).
- Gleick (2002) definisce l'acqua come un *bene sociale avente valore economico*: le caratteristiche di socialità derivano dal suo ruolo sociale e culturale e dagli effetti esterni che il suo consumo produce;
- altri autori (Bresso, 1982), parlano dell'acqua come di un bene libero, ossia di un bene disponibile in quantità illimitata o comunque tale che la sua utilità marginale sia pari a zero.

Infine, alcuni studiosi affermano che il bene è distribuito dallo Stato perché “non sostituibile”: la non sostituibilità rende quindi l'acqua un bene con forti caratteristiche di socialità e l'accesso alla risorsa un problema di carattere equitativo.

Si potrebbe, infatti, considerare l'acqua come un bene meritorio, un bene così importante da legittimare un intervento pubblico, anche contro la volontà dei consumatori, qualora il consumo realizzato nel libero mercato non sia soddisfacente. L'intervento pubblico è inoltre necessario viste le caratteristiche dell'offerta del bene: da un lato infatti la gestione dei servizi idrici comporta consistenti economie di scala e di coordinamento, oltre a richiedere l'utilizzo efficiente e sincronizzato di un'ampia rete di distribuzione essenzialmente non duplicabile, dall'altro la manutenzione, l'ampliamento e il miglioramento delle infrastrutture utilizzate per raccogliere, stoccare e distribuire l'acqua richiedono quindi un'ampia disponibilità di risorse finanziarie.

Pertanto una mera gestione privatistica del bene non è in grado di considerare pienamente le externalità sociali, i problemi ambientali, le caratteristiche specifiche della risorsa mentre una gestione pubblica che non leghi le politiche di prezzo alle ragioni di scarsità (relativa e assoluta) o di costo, implica il rischio di un sovrautilizzo dell'acqua riducendone la disponibilità nel futuro.

In conclusione il bene acqua ha caratteristiche tali da non poter essere trattato come un bene economico tradizionale. La sua gestione infatti necessita di coniugare esigenze sociali ed economiche, consumi privati e benefici collettivi nonché di prevedere un'efficiente ed efficace gestione delle infrastrutture essenziali.

Principali approcci e strumenti in uso

Da quanto precedentemente esposto emerge come i beni ambientali sfuggano alla logica di mercato e pertanto il loro valore non può essere determinato attraverso l'analisi tradizionale delle curve di domanda e offerta. Il mercato non è in grado, infatti, di valutare né i benefici derivanti da un miglioramento nella qualità ambientale né i danni derivanti dallo sfruttamento dell'ambiente. È evidente allora come la definizione del “valore economico di una risorsa ambientale”, ossia l'attribuzione di un corrispettivo monetario ad essa, debba superare i limiti del valore di scambio e abbracciare una nozione di valore più ampia che consideri tutte le ragioni per le quali la risorsa ambientale è fonte di utilità per la collettività.

A livello comunitario i concetti di valore economico di un bene ambientale e di “costo ambientale” emergono con forza con l'emanazione della Direttiva quadro 2000/60/CE.

L'art. 5 della Direttiva dispone infatti nella fase di caratterizzazione del distretto idrografico e valutazione dell'impatto ambientale delle attività umane, l'esecuzione di un'analisi economica dell'utilizzo idrico secondo quanto stabilito nell'allegato 3.

L'analisi economica degli usi delle acque non si limita alla sola considerazione degli aspetti finanziari inerenti alle fasi di erogazione del servizio, ma mira ad estendere l'ambito di

valutazione anche ad attività incluse negli usi di carattere sociale e produttivo (industriale, agricolo, idroelettrico, ecc.) determinanti lo stato qualitativo delle acque e molto importanti in termini di occupazione e produzione.

Nel realizzare questa analisi gli Stati membri dovevano attenersi ad una serie di disposizioni, su tutte, quella di tener conto del principio del recupero dei costi dei servizi idrici, compresi i costi ambientali e relativi alle risorse, e, in particolare, del principio “chi inquina paga”. L’analisi economica quindi consiste nella elaborazione di informazioni sufficienti e adeguatamente dettagliate al fine di effettuare i pertinenti calcoli necessari per prendere in considerazione il principio del recupero dei costi dei servizi idrici (art. 9) e di formarsi un’opinione circa la combinazione delle misure più redditizie, relativamente agli utilizzi idrici, da includere nel programma di misure di cui all’articolo 11 in base ad una stima dei potenziali costi di dette misure.

Essa si articola nelle seguenti fasi:

- definire gli usi e i servizi idrici;
- identificare i distributori, gli utilizzatori e gli “inquinatori”;
- calcolare i costi finanziari dei servizi idrici;
- identificare e stimare i Costi Ambientali e della Risorsa (CAR);
- identificare il meccanismo di recupero dei costi;
- calcolare il tasso di recupero dei costi;
- identificare l’allocazione dei costi per utilizzatore ed “inquinatore”.

È evidente dalle disposizioni della Direttiva che i CAR assumo un ruolo centrale nella definizione dell’importanza economica della risorsa e quindi dell’efficiente allocazione tra i vari settori. Dai gruppi di lavoro comunitari per l’implementazione delle vari fasi della Direttiva, analizziamo in dettaglio le rispettive caratteristiche:

- I costi ambientali (Figura 1) (DM 39/2015) riferiti al concetto di danno ambientale, sono costi legati ai danni che l’utilizzo stesso delle risorse idriche causa all’ambiente, agli ecosistemi e a coloro che usano l’ambiente (es. una riduzione della qualità ecologica degli ecosistemi acquatici o la salinizzazione e degradazione dei terreni produttivi). Essi si identificano con l’alterazione/riduzione delle funzionalità degli ecosistemi acquatici o il degrado della risorsa (sia per le eccessive quantità addotte sia per la minore qualità), tali da danneggiare alcuni usi dei corpi idrici (es. la produzione, il consumo, la pesca sportiva) o il benessere derivante dal valore assegnato al non-uso di una certa risorsa (es. gli effetti sull’utilità connessa alla contemplazione di un lago pulito o di un parco naturale).
- I costi della risorsa (Figura 2) (DM 39/2015) riferiti al concetto di costo opportunità, rappresentano invece i costi delle mancate opportunità imposte ad altri utenti in conseguenza dello sfruttamento intensivo delle risorse al di là del loro livello di ripristino e ricambio naturale (es. legati all’eccessivo emungimento di acque sotterranee). Essi tengono conto della disponibilità idrica spazio-temporale, dei fabbisogni attuali e futuri, della riproducibilità della risorsa e della qualità della stessa, nonché dei vincoli di destinazione e degli effetti economico-sociali e ambientali producibili dai diversi usi e non usi (impatto sull’economia, effetti sull’indotto, impatto ambientale, benefici sociali). Concorrono alla scelta dell’uso o non uso a cui destinare l’acqua, la scarsità della risorsa da utilizzare, la qualità della stessa e la rinuncia ai benefici dell’uso alternativo rispetto a quello scelto.

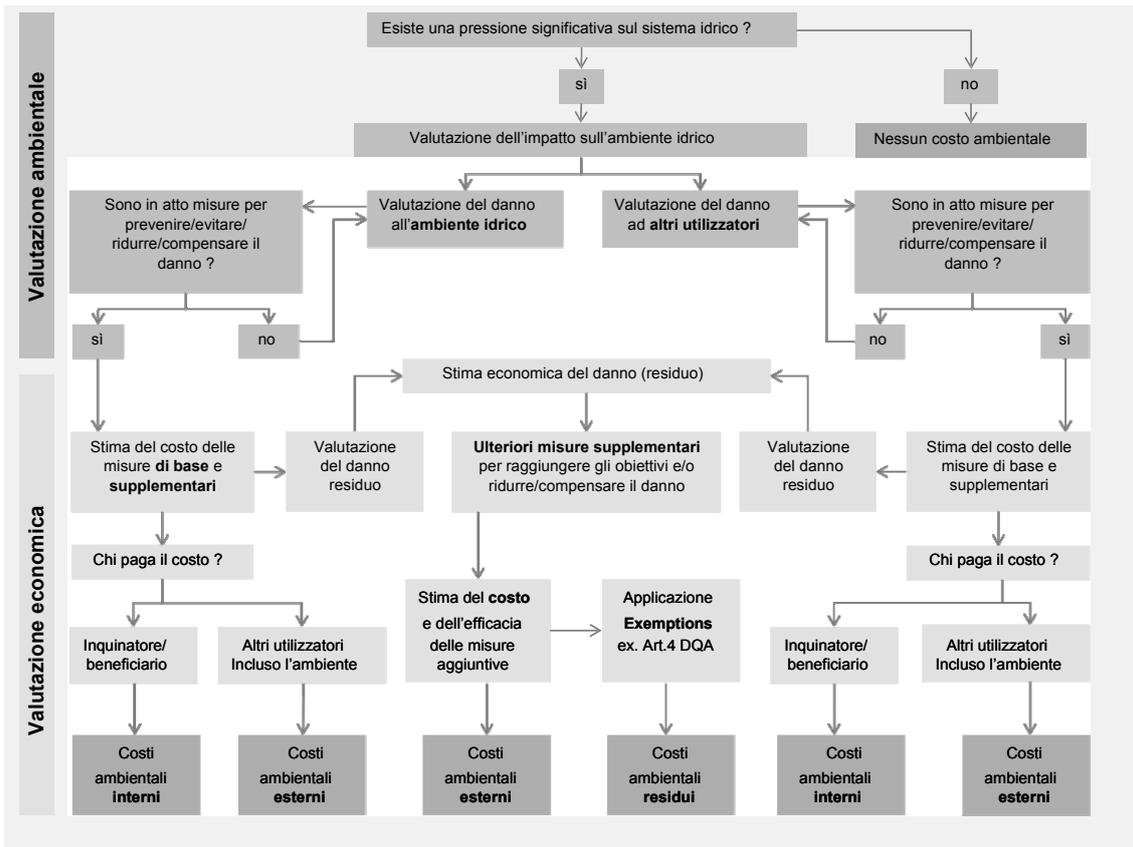


Figura 1. Procedura di individuazione dei costi ambientali secondo il Decreto 39/2015

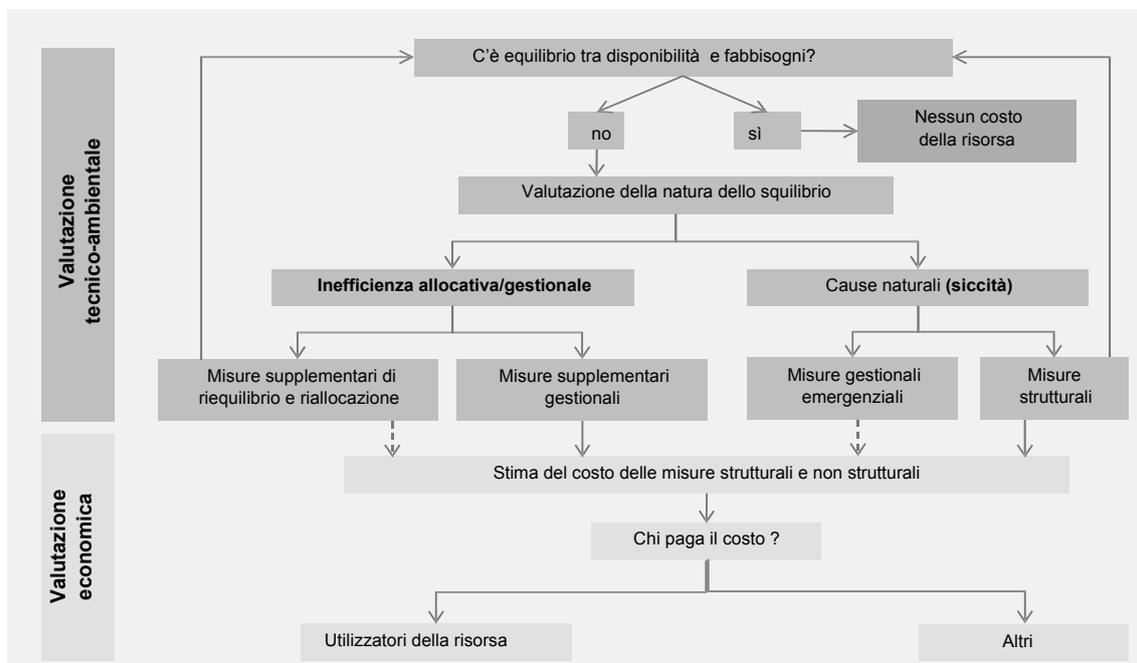


Figura 2. Procedura di individuazione dei Costi della risorsa secondo il Decreto 39/2015

I CAR devono essere considerati nella definizione della Tariffa idrica che appunto, oltre ai normali costi di natura finanziaria (operativi, di gestione e manutenzione e del capitale) deve considerare anche gli impatti ambientali connessi con il consumo di acqua. Il costo pieno dell'acqua così determinato rappresenta una stima del suo valore economico.

Vediamo di seguito cosa significa concettualmente determinare tale valore.

In linea generale, l'attività di valutazione economica implica la misurazione, attraverso una qualche unità di misura convenzionale, della capacità di un bene di essere utile e quindi di soddisfare determinati bisogni. Come discusso precedentemente, in presenza di esternalità negative, risulta necessario identificare la curva del costo esterno, ossia cercare di misurare i danni ambientali. Tale misurazione è effettuata in termini monetari, dal momento che i benefici privati degli inquinatori sono espressi in questa unità di misura: la moneta, infatti, è utilizzata come strumento di misurazione dei guadagni e delle perdite di utilità (o di benessere). L'idea fondamentale per la misurazione in termini monetari dei benefici è che gli individui rivelino le loro preferenze per i beni ambientali mostrando la loro Disponibilità A Pagare (DAP). Il prezzo di mercato costituisce la guida iniziale per misurare tale disponibilità, e quindi, la spesa totale per il bene rappresenta la prima approssimazione del beneficio ricevuto. Ovviamente, la ragione per la quale la moneta viene utilizzata come unità di misura è che tutti esprimono le proprie preferenze in termini monetari: se acquistiamo un bene, ad esempio, esprimiamo la nostra disponibilità a pagare offrendo moneta in cambio di quel bene, e indirettamente riflettiamo il valore economico che viene attribuito al bene in questione Pearce e Turner (1991). La DAP, quindi, rappresenta un indicatore monetario immediato delle preferenze individuali. Tuttavia, non è possibile assumere con certezza che la DAP (misurata ai prezzi di mercato) misuri in maniera accurata l'intero beneficio, per gli individui e la società; potrà infatti accadere che alcuni individui saranno disposti a pagare di più del prezzo di mercato, per cui il beneficio che essi otterranno sarà maggiore. Il surplus così ottenuto è chiamato surplus del consumatore. Questa considerazione è importante perché ci permette di affermare che:

$$\text{DAP lorda} = \text{prezzo di mercato} + \text{surplus del consumatore}$$

Al fine di misurare il beneficio totale sarà allora necessario considerare tutta l'area sottesa alla curva di domanda del bene. Sebbene una digressione sul fondamento tecnico della misurazione del beneficio (variazione compensativa versus variazione equivalente) non sia possibile in questa sede, è opportuno distinguere tra la disponibilità a pagare e la Disponibilità ad Accettare una Compensazione (DAC). Malgrado la teoria economica suggerisca che le due misure siano pressoché equivalenti, le indagini empiriche mostrano come le differenze possano essere anche significative. Nei casi di danno ambientale, ad esempio, quanto gli individui siano disposti a pagare per evitare il danno e quanto essi siano disposti ad accettare come compensazione per sopportare il danno possono differire sostanzialmente.

Naturalmente l'approccio monetario presenta numerosi limiti. In primo luogo, tale approccio monetizza le preferenze degli individui per una variazione nella fornitura di un bene non di mercato (es. qualità ambientale) e non il valore del bene in sé. Spesso le persone non hanno preferenze ben definite in termini monetari per i beni non di mercato; può quindi essere necessario fornire informazioni aggiuntive per consentire la formazione di tali preferenze. La disponibilità a pagare, dipendendo dalla capacità di pagare, è distorta dalla distribuzione del reddito.

A livello teorico, il problema della valutazione economica dei beni ambientali ha subito, negli ultimi decenni, una profonda rielaborazione, soprattutto a causa della pressione politiche rivolte al cambiamento della politica ambientale. Nel corso degli anni '80, in particolare, le critiche rivolte alla teoria microeconomica tradizionale di non tenere conto nelle valutazioni monetarie dei beni ambientali dei valori diversi da quelli di puro utilizzo ha spinto verso

l'introduzione del concetto di Valore Economico Totale (VET). Nonostante esistano approcci diversi, e non vi sia accordo unanime circa la terminologia utilizzata, in economia ambientale si è giunti ad identificare una precisa tassonomia dei valori economici dei beni ambientali (Figura 3).

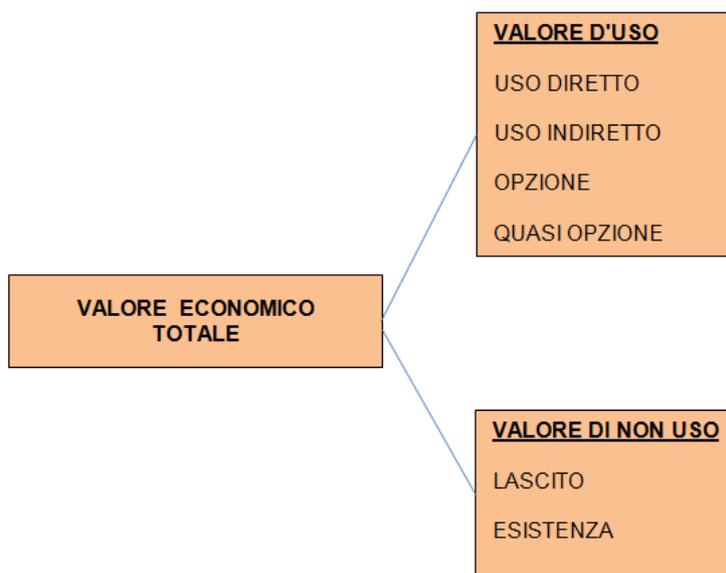


Figura 3. Componenti del valore economico totale

Il VET di una risorsa ambientale è composto da “valori d’uso” e “valori di non uso” (o intrinseci). Appartengono alla prima categoria, i valori d’uso (diretto e indiretto) e i valori d’opzione e quasi opzione; rappresentano, invece, valori di non uso, il valore di lascito e il valore d’esistenza. Il VET risulta quindi pari a:

$$\text{VET} = \text{valore d'uso diretto} + \text{valore d'uso indiretto} + \text{valore d'opzione e quasi opzione} \\ + \text{valore di esistenza} + \text{valore di lascito}$$

Analizziamo brevemente le diverse componenti.

Il valore d’uso rappresenta la principale componente del valore economico di una risorsa ambientale. Gran parte del valore che da questo deriva è legato, infatti, all’utilità percepita dai consumatori attraverso la fruizione. Alcuni autori distinguono tra valore d’uso diretto, che deriva dalla fruizione diretta della risorsa naturale (si pensi, ad esempio, al piacere che deriva dall’utilizzo di un fiume per gli appassionati di rafting), e valore d’uso indiretto, legato ai benefici indiretti che gli individui ricevono dall’utilizzo della risorsa (si pensi, ad esempio, agli appassionati di rafting che beneficiano, nel corso di un’escursione, degli effetti paesaggistici).

Il valore di opzione è legato al desiderio di assicurare la disponibilità del bene per un potenziale utilizzo futuro. Esso assume particolare rilevanza quando vi sono situazioni di incertezza sulla disponibilità futura della risorsa ambientale, come, ad esempio, per i c.d. beni irriproducibili o per i beni la cui offerta non è in grado di adeguarsi alle variazioni della domanda. Il valore d’opzione corrisponde, in linea teorica, all’ammontare di un ipotetico premio assicurativo pagato al fine di avere la garanzia della disponibilità futura del bene per un uso

diretto o indiretto. I soggetti avversi al rischio saranno, infatti, disposti a pagare una somma di denaro per garantirsi tale disponibilità in futuro. Il valore di quasi opzione individua, invece, il valore attribuito alla possibilità di preservare la risorsa per utilizzi futuri non ancora identificati e conseguenti al processo di sviluppo tecnologico. In altre parole, esso rappresenta il valore del potenziale aumento di conoscenza che può derivare dalla semplice esistenza di quel bene.

Oltre al valore d'uso, esistono altre valenze, sinteticamente definite come valori di non uso, del tutto indipendenti dall'utilizzo individuale del bene. Ad esempio, il valore di lascito si identifica con l'utilità derivante dalla consapevolezza che, grazie al proprio interessamento, anche le generazioni future potranno godere di determinate risorse ambientali (atteggiamento di tipo altruistico). Dal punto di vista economico, tale valore è esprimibile quindi come la disponibilità a pagare da parte di un soggetto per la conservazione di un certo bene affinché le generazioni future possano disporne. È evidente allora come tale concetto sia affine al valore di opzione, nel senso che come questo si riferisce a fruizioni differite nel tempo, è correlato all'uso di una risorsa, ma è condizionato dall'incertezza sulla sua disponibilità futura. Il valore di esistenza è invece legato alla possibilità di preservare il bene da una possibile distruzione a prescindere da qualunque considerazione legata all'uso attuale o futuro di tale risorsa. Tale valore si riferisce, infatti, all'utilità percepita dai soggetti per il solo fatto che le risorse continuano ad esistere, indipendentemente dalla possibilità di trarne un beneficio dall'uso. In termini economici, tale valore è misurato dalla disponibilità a pagare per l'esistenza o la salvaguardia di determinati beni.

L'introduzione del VET ha segnato un indubbio passo in avanti nelle valutazioni economiche dei beni ambientali. In letteratura, oggi, esiste un sostanziale accordo sul fatto che le componenti appena richiamate possano influire, almeno in linea teorica, sul valore di una risorsa ambientale. Tuttavia, esistono numerose perplessità legate alla possibilità di quantificare valori come quelli di esistenza, per i quali non esiste un riferimento di mercato. Naturalmente, tale problema può essere ridimensionato considerando il peso relativo che le diverse componenti assumono in termini di effettivo contributo al VET. Nel caso della stima degli effetti misurabili del danno ambientale, infatti, tale operazione consente una notevole semplificazione delle operazioni di stima, garantendo la possibilità di trascurare alcune componenti irrilevanti (Naturalmente tale operazione di distinzione non è facile e numerosi autori sono scettici circa la effettiva possibilità empirica di quantificazione economica di ciascuna componente, ossia in modo separato l'una dall'altra.). In linea generale, la rilevanza delle componenti di non uso dipende da tre elementi fondamentali:

- *irreversibilità del bene*: se il bene non viene preservato, le possibilità di rigenerazione sono assai complesse e i tempi ancor più lunghi;
- *incertezza*: in quanto il futuro non è noto e gli attuali errori di gestione della risorsa possono generare dei costi potenziali futuri difficili da determinare;
- *unicità*: il bene in questione non è facilmente sostituibile, si preferirà quindi la preservazione piuttosto che lo sfruttamento indiscriminato.

In altre parole, l'importanza dei valori di non uso dipende da numerosi fattori come la natura del bene, la sua disponibilità attuale, il grado di informazione e di protezione, la domanda e l'opportunità di fruizione. Più il bene è raro, o non sostituibile, più sono rilevanti i valori di non-uso.

Come rilevato da numerosi autori esiste una notevole confusione nella classificazione e nomenclatura dei diversi metodi di valutazione. Malgrado la maggior parte degli autori distingua tra metodi diretti (o delle preferenze dichiarate) e metodi indiretti (o delle preferenze rivelate), i differenti significati attribuiti alla parola "diretto" da parte dei diversi autori, ha infatti impedito la formazione di un linguaggio comune. Al fine di evitare tale confusione si distinguerà tra metodi di stima *market oriented* e metodi di stima *survey oriented* (Figura 4).

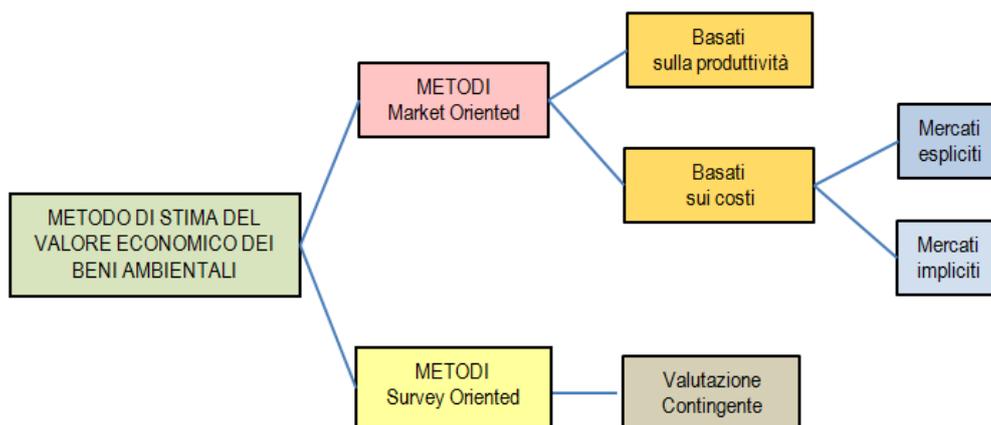


Figura 4. Classificazione dei metodi di stima del valore economico dei beni ambientali

Per quanto riguarda i metodi *market oriented*, basati sui costi, assumono particolare rilevanza le tecniche orientate a mercati espliciti, ossia basate su dati di prezzo e quantità ricavati da mercati effettivi. È possibile distinguere le seguenti tecniche:

- *costo di ripristino*: ricostruzione e stima delle spese che sarebbe necessario sostenere per riportare i beni ambientali danneggiati alla situazione precedente il danno (baseline);
- *costo di sostituzione*: ricostruzione e stima delle spese che sarebbe necessario sostenere per beni prodotti dall'uomo che possano sostituire i beni o i servizi ambientali compromessi;
- *costo del progetto ombra*: ricostruzione e stima delle spese che sarebbe necessario sostenere per creare un progetto alternativo alla risorsa ambientale danneggiata;
- *costo di rilocalizzazione*: ricostruzione e stima delle spese che sarebbe necessario sostenere per spostare altrove le attività economiche danneggiate a causa della riduzione della qualità ambientale;
- *spese difensive*: ricostruzione e stima delle spese che sarebbe necessario sostenere per evitare o prevenire impatti sulle componenti ambientali: impianti di depurazione, purificatori, spostamento della fonte inquinante, tecniche alternative di lavorazione agricola, ecc.

Le tecniche orientate a mercati impliciti utilizzano, invece, dati di prezzo e quantità ricavati da mercati di beni surrogati rispetto a quello ambientale da valutare. È possibile distinguere i seguenti metodi:

- *prezzi edonici* (Griliches, 1971; Rosen, 1974): si fa riferimento al valore di mercato di particolari beni succedanei complementari ai beni ambientali. Si ricorre a questi metodi quando i beni ambientali danneggiati sono intangibili (paesaggio incontaminato, aria pulita, silenziosità di un luogo);
- *costi di viaggio* (Clawson & Knetsch, 1966): si fa riferimento alle spese sostenute dagli individui per raggiungere una determinata località, e si assume che tali cifre rappresentino l'effettivo valore che gli individui attribuiscono al sito.

Le tecniche orientate alla produttività considerano invece l'ambiente naturale come fattore di produzione (Ellis & Fisher, 1987; Maler, 1992; Freeman, 1993):

$$Q = f(K, L, E)$$

dove Q rappresenta il prodotto, K il capitale, L il lavoro ed E un indicatore di qualità ambientale.

Qualora la forma algebrica della funzione di produzione sia nota è possibile calcolare l'effetto che una variazione della qualità ambientale ha sulla produzione. Se un danno altera la quantità o il prezzo di un bene (o di un servizio) fornito da una qualità ambientale, il valore monetario di tale cambiamento costituisce, quindi, una misura del danno alla qualità ambientale stessa. Le risorse coinvolte da possibili danni sono, in particolare, quelle legate alla pesca, ad agricoltura e foreste, alla produzione di acqua e di energia.

In linea generale, i metodi orientati al mercato presentano una serie di criticità:

- le stime sono dipendenti dal mercato e dunque da fattori contingenti;
- esistono delle difficoltà nella ripartizione della responsabilità dei danni nello spazio e nel tempo, in caso di più inquinatori;
- sono difficilmente applicabili ai casi di danno atmosferico, alla falda, a bacini idrici di vaste dimensioni;
- sono di difficile applicabilità al concetto di biodiversità;
- non sono applicabili qualora i danni ambientali siano, in massima parte, localizzati in aree marginali, di pregio modesto e con scarso valore d'uso per la collettività.

Per quanto riguarda i metodi *survey oriented*, le tecniche orientate a mercati ipotetici, o di valutazione contingente, sono invece basate su interviste attraverso le quali viene stimata la DAP degli individui, o di un insieme di individui, per particolari beni e servizi ambientali. In alternativa, sempre tramite interviste, tali tecniche si affidano a valutazioni di tali beni e servizi fornite da esperti. Il valore di un bene ambientale viene così individuato attraverso la ricostruzione della disponibilità a pagare degli individui per un beneficio ambientale o la disponibilità ad accettare compensi per un costo ambientale (DAC). Tale disponibilità viene stimata attraverso domande dirette su preferenze personali riguardo l'ambiente, o dedotta analizzando le scelte da essi effettuate in simulazioni in cui vengono proposti beni o servizi ambientali alternativi.

Limiti e considerazioni

Sebbene il concetto di VET di una risorsa ambientale rappresenti un avanzamento dal punto di vista teorico, i metodi utilizzati per la sua valutazione non permettono una chiara quantificazione dei diversi elementi che lo compongono. Con riferimento alla letteratura analizzata, tale fenomeno non è sorprendente: da una parte abbiamo visto come l'economia ambientale, tentando di riportare all'interno dell'impostazione standard i problemi di carattere ambientale, non permette di considerare in maniera soddisfacente parte dei valori di non uso (Gowdy & Erickson, 2005); dall'altra, l'economia ecologica, sebbene interessata al valore intrinseco del capitale naturale non sembra ancora in grado di esprimere, a livello operativo, metodi in grado di quantificare il valore economico di una risorsa.

Passando dalla teoria alla pratica, per una quantificazione del VET delle risorse ambientali bisogna scontrarsi con le evidenti criticità che i diversi metodi di valutazione presentano. Le metodologie *market oriented* permettono di stimare, prevalentemente, solo il valore d'uso, diretto e indiretto, dei beni ambientali; mentre le metodologie *survey oriented* malgrado permettano di individuare sia il valore d'uso che il valore di non uso, risultano altamente arbitrarie.

Anche riguardo ai costi ambientali e della risorsa si riscontrano notevoli difficoltà di quantificazione. Essi poi sono direttamente legati ai concetti di valore d'uso e di non uso e la mancanza di una metodologia universalmente riconosciuta per una loro quantificazione, non

consente di ottenere quindi il “costo pieno” dell’acqua che abbiamo visto rappresentare il suo VET.

Per di più, se considerati in tariffa, comporterebbero un prezzo dell’acqua estremamente elevato, ponendo anche problemi di accesso ed equità sociale. Le valutazioni economiche circa le risorse naturali, quindi, difficilmente si inseriscono in un contesto teorico ben definito. Esse dipendono tra l’altro dalle caratteristiche intrinseche dei beni ambientali, dagli effetti prodotti dal loro uso e dalle difficoltà di definizione dei prezzi e dalla soggettività dei giudizi, per cui nonostante le difficoltà già illustrate, la quantificazione del valore economico dell’acqua ancorché parziale, ha lo scopo fondamentale di segnalare ai responsabili pubblici e ai cittadini, che l’acqua non solo ha un valore perché costa (tariffe), ma perché è scarsa ed è una delle cause della ricchezza, benessere e reddito di un territorio.

Bibliografia

- Boulding K. The economics of the coming Spaceship Earth. In: Jarrett H (Ed.). *Environmental quality in a growing economy*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1966. p. 3-14.
- Bresso M. *Pensiero economico e ambiente*. Torino: Loescher Editore; 1982.
- Bresso M. Riflessioni su un quarto di secolo dell’economia dell’ambiente: strumenti di analisi e questioni teoriche aperte. In: Musu I (Ed.). *Economia e Ambiente Atti XXXII Riunione della Società Italiana degli Economisti*. Roma 18-19 Ottobre 1991. Bologna: Il Mulino; 1993. p. 65-66.
- Clawson M, Knetsch J. *Economics of outdoor recreation*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1966.
- Daly HE. *Steady-state economics*. San Francisco: Freeman; 1977.
- Delbono F, Lanzi D. Il problema dell’acqua: privatizzazione e sostenibilità. *Economia Pubblica* 2005;25(3):5-26.
- Ellis GM, Fisher A. Valuing the environment as an input. *Journal of Environmental Management* 1987;25:49-156.
- Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l’azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* L 327/1 del 22/12/2000.
- Freeman AM. *The measurement of environmental and resource values: theory and methods*. Washington, DC: Resources for the Future Inc.; 1993.
- Gleick PH, Wolff G, Chalecki EL, Reyes R. *The new economy of water: The risks and benefits of globalization and privatization of fresh water*. Oakland, CA: Pacific Institute for Studies in Development, Environment and Security; 2002.
- Gowdy J, Erickson J. Ecological economics at a crossroads. *Ecological Economics* 2005;53:17-20.
- Griliches Z. *Price indexes and quality changes*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1971.
- Kapp W. *Social costs of business enterprise*. London: Asia Publishing House; 1963.
- Maler KG. Production function approach in developing countries. In: Vincent JR, et al. (Ed.). *Valuing environmental benefits in developing countries*. East Lansing, MI: Michigan State University; 1992. (Special report 29)
- MATTM - Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Decreto 24 febbraio 2015, n. 39 Regolamento recante i criteri per la definizione del costo ambientale e del costo della risorsa per i vari settori d’impiego dell’acqua. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 81 del 8/4/2015.
- Meadows DH, et al. *I limiti dello sviluppo*. Milano: Mondadori; 1970.

Passet R. *L'economique et le vivant*. Paris: Payot; 1979.

Pearce DW, Turner KR. *Economia delle risorse naturali e dell'ambiente*. Bologna: Il Mulino; 1991.

Rosen S. Hedonic prices and implicit markets. *Journal of Political Economy* 1974;82:34-5.

Stiglitz J. *Economia del settore pubblico*. Milano: Hoepli; 2003.

World Commission on the Environment and Development ('Commissione Brundtland'), *Our common future*. Oxford: Oxford University Press; 1987.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di aprile 2017, 1° Suppl.*

*Stampato in proprio
Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, aprile 2017