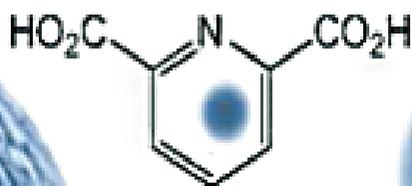


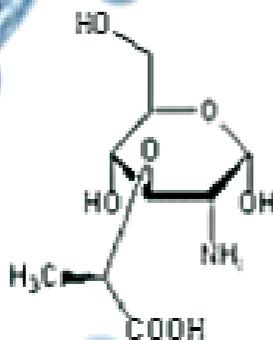
PROCEDURA SPERIMENTALE PER LA DETERMINAZIONE DELLA COMPONENTE BATTERICA DEL MATERIALE PARTICOLATO

INAIL

2020



COLLANA **SALUTE E SICUREZZA**



PROCEDURA SPERIMENTALE PER LA DETERMINAZIONE DELLA COMPONENTE BATTERICA DEL MATERIALE PARTICOLATO

INAIL

2020

Pubblicazione realizzata da

Inail

Dipartimento innovazioni tecnologiche
e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici

Autori

Donatella Pomata¹, Patrizia Di Filippo¹, Carmela Riccardi¹, Francesca Buiarelli²,
Giulia Simonetti², Federica Castellani²

¹ Inail, Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici

² Università degli Studi di Roma "La Sapienza" - Dipartimento di Chimica

per informazioni

Inail - Dipartimento innovazioni tecnologiche
e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici
via Roberto Ferruzzi, 38/40 - 00143 Roma
dit@inail.it
www.inail.it

© **2020 Inail**

ISBN 978-88-7484-600-9

Gli autori hanno la piena responsabilità delle opinioni espresse nelle pubblicazioni, che non vanno intese come posizioni ufficiali dell'Inail.

Le pubblicazioni vengono distribuite gratuitamente e ne è quindi vietata la vendita nonché la riproduzione con qualsiasi mezzo. È consentita solo la citazione con l'indicazione della fonte.

Presentazione

La caratterizzazione delle componenti del bioaerosol è oggetto di crescente interesse nella comunità scientifica, soprattutto per gli effetti che tali componenti hanno sulla salute umana: infezioni, asma, allergie e altre malattie delle vie respiratorie. I rischi sono influenzati non solo dalla capacità di penetrazione dell'aerosol nel sistema respiratorio, ma anche dalla sua composizione e dalla sua attività biologica.

Batteri, virus e funghi rientrano tutti nella definizione di agente biologico data dal d.lgs. 81/08 e sono elencati nell'allegato XLVI, che li classifica in tre gruppi (2, 3 e 4) sulla base dell'effetto esercitato su lavoratori sani.

I lavoratori operanti in realtà lavorative complesse quali riciclaggio e compostaggio dei rifiuti, aziende zootecniche e agricole, discariche e impianti di depurazione, sono sottoposti a rischio di esposizione al bioaerosol in dipendenza dal tipo di lavoro, dalla vicinanza alla sorgente e dalle misure di abbattimento presenti. Per poter valutare correttamente l'esposizione di tali lavoratori, è necessario campionare e caratterizzare il bioaerosol tramite idonee tecniche di misura.

Le metodologie ad oggi principalmente utilizzate per determinare le componenti del bioaerosol si basano sulla coltivazione delle specie viable e successiva conta al microscopio. Questa misura, pur consentendo la determinazione delle sole specie vitali coltivabili, è necessaria per conoscere la qualità microbiologica dell'aria. Sono escluse da questa determinazione tutte le specie "non vitali" e "vitali, ma non coltivabili", che possono tuttavia essere la causa specifica di allergie ed altre patologie dell'apparato respiratorio. In alternativa, la totalità del bioaerosol presente nel particolato aerodisperso può essere valutata tramite la determinazione della concentrazione di specifici composti chimici, indicatori della presenza di molecole biologiche più complesse.

Il Dipartimento propone, con il presente lavoro, l'analisi degli acidi muramico e dipicolinico come indicatori della presenza, rispettivamente, di batteri e spore batteriche aerodisperse.

Carlo De Petris
*Direttore del Dipartimento innovazioni
tecnologiche e sicurezza degli impianti,
prodotti e insediamenti antropici*

Indice

PREMESSA	7
1. Introduzione	9
1.1 Bioaerosol negli ambienti di lavoro	9
1.2 Componente batterica del bioaerosol: cellule e spore batteriche	9
1.3 Biomarker chimici in studio	10
1.3.1 Acido Muramico	11
1.3.2 Acido Dipicolinico	12
2. Determinazione della componente batterica del bioaerosol	13
2.1 Metodo analitico per la determinazione della componente batterica aerodispersa	13
2.1.1 Estrazione e purificazione	13
2.1.2 Analisi in HPLC-ESI-MS/MS	14
2.2 Analisi Quantitativa	15
2.2.1 Curve di calibrazione in solvente e con il metodo delle aggiunte standard	15
2.2.2 Qualità del dato	16
2.3 Fattori di Conversione della quantità di biomarker in massa batterica	17
2.3.1 Cellule Batteriche	17
2.3.2 Spore Batteriche	18
2.4 Quantità di batteri e spore batteriche in campioni di materiale particolato	19
2.4.1 Campionamento	19
2.4.2 Risultati	20
3. CONCLUSIONI	24
BIBLIOGRAFIA	25

Premessa

Le particelle di aerosol biologico, oltre a pollini, detriti di piante e animali, cellule epiteliali, virus, funghi, includono anche batteri e spore batteriche [Matthias-Maser et al., 1999; Matthias-Maser et al., 2000; Di Filippo et al., 2003]. Il crescente interesse della comunità scientifica per la caratterizzazione delle componenti del bioaerosol è legato soprattutto agli effetti che tali componenti hanno sulla salute umana: infezioni, asma, allergie e altre malattie delle vie respiratorie.

Le cellule batteriche disperse nell'aria possono essere rilasciate nell'atmosfera dalle superfici di acqua e suolo, dalla vegetazione e da fonti antropogeniche (impianti di trattamento delle acque reflue, trattamento dei fanghi, degli scarti animali, processi di fermentazione, attività agricole ecc.) [Hejkal et al., 1980; Lindemann et al., 1985; Sawyer et al., 1996; Jaenicke et al., 2005]; anche il trasporto globale di polvere influenza la quantità e la composizione dei batteri nell'atmosfera [Brodie et al., 2007]. I batteri sono generalmente adesi alle particelle aerodisperse [Bauer et al., 2002] indipendentemente dalla loro dimensione. La dimensione di una particella batterica dispersa nell'aria influenza il suo coefficiente di penetrazione e la velocità di deposizione nel tratto respiratorio umano e quindi il suo grado di infettività [Peccia et al., 2008].

Diverse norme tecniche UNI [UNI EN ISO 14698-1:2004, UNI EN ISO 14698-2:2004, UNI 11108:2004, UNI EN 13098:2019, UNI CEN/TS 16115-1:2011, UNI EN 14031:2005] riportano i principi generali e i metodi per il controllo della biocontaminazione e la valutazione e interpretazione dei dati nell'ambiente e nei luoghi di lavoro. Generalmente, tali metodi prevedono la coltivazione su piastra e la successiva conta al microscopio del numero delle colonie cellulari cresciute sulla superficie del terreno utilizzato, le cosiddette Unità Formanti Colonia (*Colony Forming Unit*, CFU). Il livello di biocontaminazione è espresso in termini di CFU per m³ di aria oppure per cm² di superficie. Tale metodo, tuttavia, presenta errori dovuti all'accuratezza del conteggio stesso, all'incertezza dell'identificazione delle colonie e alla presenza di anomalie di crescita [Di Filippo et al. 2017].

Il campionamento dell'aerosol batterico può essere eseguito sia collezionando le particelle aerodisperse in mezzi o supporti destinati alla coltivazione, sia raccogliendo il particolato su membrane filtranti. Mentre nel primo caso vengono rivelati solo i microrganismi vitali, quando il bioaerosol viene raccolto su filtri è possibile determinare sia batteri vitali che non vitali, a seconda del metodo di analisi uti-

lizzato. Poiché l'aerosol biologico può causare effetti avversi sulla salute umana indipendentemente dalla vitalità [Wady et al., 2004], al fine di determinare il contenuto totale di bioaerosol in atmosfera, l'analisi può essere eseguita sia mediante tecniche di biologia molecolare che mediante l'uso di *biomarker* chimici [Di Filippo et al., 2003; Buiarelli et al., 2013; Buiarelli et al., 2013; Di Filippo et al., 2014; Blais-Lecours 2015; Perrino et al., 2016]. In quest'ultimo caso, le concentrazioni di opportuni indicatori chimici, ottenute dopo estrazione da campioni di particelle e successiva determinazione analitica, possono essere trasformate, mediante fattori di conversione, in bioaerosol specifico [Pietrogrande et al., 2013].

Pertanto, in mancanza di metodi di monitoraggio standardizzati e allo scopo di dare un'informazione quantitativa della componente batterica totale (*viable* e non *viable*, coltivabile e non coltivabile) dispersa nell'aria, il presente lavoro propone una procedura analitica per la determinazione quantitativa della componente batterica aerodispersa, applicabile sia agli ambienti *outdoor* che *indoor*.

A tale scopo è stato ottimizzato nel nostro laboratorio un metodo di estrazione ed analisi, da campioni di materiale particolato, di due *biomarker* chimici: acido muramico e acido dipicolinico come indicatori, rispettivamente, di batteri e spore batteriche aerodispersi.

1. Introduzione

1.1 Bioaerosol negli ambienti di lavoro

Il bioaerosol è composto da microrganismi come virus, batteri, funghi, spore e da frammenti di materiali biologici come pollini, peli di animali, detriti di pelle, escrementi e residui vegetali [Di Filippo et al. 2016]. Una componente importante del bioaerosol è rappresentata dalle specie batteriche che per le loro caratteristiche di permanenza in atmosfera ed interazione con l'uomo e gli animali costituiscono un rischio per la salute. Problemi respiratori, danni polmonari, allergie e cefalea sono soltanto alcuni dei potenziali danni che l'esposizione ad ambienti contaminati da batteri potrebbe provocare sull'uomo.

Numerose sono le realtà lavorative in cui si può avere esposizione ad agenti biologici, ad esempio negli impianti di riciclaggio dei rifiuti, nelle attività di compostaggio dei rifiuti organici, nelle aziende zootecniche, agricole e biotecnologiche produttrici di enzimi altamente purificati, nelle industrie alimentari e di detergenti che fanno uso di enzimi, nelle aziende per la lavorazione delle pelli ecc.

In tali ambienti gli agenti microbiologici presenti nell'aria sono aerotrasportati sotto forma di bioaerosol, legati a polvere, particelle liquide o altri vettori naturalmente presenti (emulsioni oleose, polvere di legno ecc.), con conseguente rischio, per i lavoratori, di esposizione per via inalatoria, per contatto con superfici e oggetti contaminati o per ingestione.

La prevenzione e la protezione dagli agenti biologici sono trattate, a livello normativo, nel titolo X del d.lgs. 81/08 e successive modifiche (d.lgs. 106/09), che però non fornisce valori di carica batterica o fungina a cui far riferimento per una idonea valutazione della qualità dell'aria negli ambienti di lavoro.

Infatti, mancando metodi efficaci per misurare quantitativamente gli agenti biologici e non essendo disponibili sufficienti informazioni sulle relazioni dose-risposta, non sono ancora stati stabiliti limiti di esposizione [Douwes et al., 2003].

1.2 Componente batterica del bioaerosol: cellule e spore batteriche

In atmosfera i batteri possono essere presenti come cellule singole o ancorarsi a superfici viventi e non viventi, biologiche e non, ed unirsi fra loro o con altre piccole particelle, dando forma ad aggregati di microrganismi protetti da una matrice polimerica autoprodotta, che prendono il nome di *biofilm* [Qian et al. 2012].

I biofilm sono molto resistenti, permettono le crescite microbiche in ambienti

naturali, industriali ed ospedalieri anche nelle condizioni più ostili e sono alla base di infezioni batteriche croniche e importanti [Singh et al. 2000].

I batteri si differenziano in *viable* e *non-viable* a seconda se siano o no vitali. Irritazioni e infiammazioni delle vie aeree superiori, problemi respiratori e danni polmonari sono i maggiori effetti avversi causati dal bioaerosol e, nello specifico, dai batteri. Altri potenziali effetti sulla salute possono essere febbre, tosse, cefalea, malattie infettive, allergie, problemi cutanei, neurologici e cancro [Douwes et al. 2003]. In generale, l'azione infettiva e patogena è esercitata dai batteri *viable*, mentre i batteri non *viable* possono causare solo reazioni di tipo allergico e/o infiammatorio.

I batteri sono presenti sia nell'aria *indoor* che *outdoor* direttamente emessi dal suolo, dalla vegetazione [Zucker et al. 2004], dall'uomo [Qian et al. 2012] e dalle sue attività [Douwes et al. 2003]. La loro quantità nell'aria ambiente dipende dal sito preso in esame [Fang et al. 2007]; generalmente, maggiori concentrazioni batteriche sono osservate in ambienti urbani rispetto a quelli rurali e costieri [Mancinelli e Shulls, 1978; Shaffer e Lighthart, 1997]. In generale, è stato evidenziato che la loro concentrazione è più alta in estate e in autunno, mentre è più bassa in inverno (Borodulin et al., 2005) e, sebbene sia generalmente più bassa rispetto ad altri componenti organici del bioaerosol, i valori variano da 10^3 a 10^5 cellule m^{-3} [Sattler et al., 2001.; Bauer et al., 2002; Amato et al., 2005; Casareto et al., 2006].

In base alla composizione della parete di rivestimento della cellula, i batteri sono classificati in Gram-positivi o Gram-negativi. A causa della differente morfologia della parete cellulare, i Gram-positivi hanno maggiore possibilità di sopravvivenza anche in condizioni meno favorevoli rispetto ai Gram-negativi. Dalla letteratura emerge, infatti, che in campioni ambientali è preponderante la presenza di batteri Gram-positivi [Fang et al. 2007; Lappalainen et al., 2008] che rappresentano circa l'80-86% del totale [Shaffer et al. 1997,]. Inoltre, tra quelli rilevati nell'atmosfera, la maggior percentuale è rappresentata dai Gram-positivi del genere *Bacillus*, *Clostridium* e *Sporosarcina* che, in condizioni di vita sfavorevoli, sono capaci di riprodursi per semplice scissione, dando luogo alla formazione di particolari cellule strutturalmente e funzionalmente differenziate, chiamate spore (endospore), che permettono ai batteri di sopravvivere in uno stato di quiescenza [Kellogg e Griffin, 2006].

Le principali caratteristiche delle spore batteriche sono la resistenza al calore, alle radiazioni ultraviolette e agli agenti chimici [Setlow 2006]. La robustezza delle spore batteriche può avere notevoli conseguenze avverse per la salute umana [Beverly et al., 2000]. Nel momento in cui le condizioni ambientali tornano favorevoli, in termini di umidità e nutrienti, la spora va incontro ad un processo di germinazione in cui si origina nuovamente la cellula batterica vegetativa, che viene poi rilasciata nell'ambiente [Prescott et al. 2002].

1.3 **Biomarker chimici in studio**

Per *biomarker* si intendono composti chimici non tossici che si è oggettivamente in

grado di misurare e valutare [Biomarkers Definitions Working Group 2001] e che possono essere utilizzati come indicatori di strutture più grandi e/o bioattive più complesse [Buiarelli et al. 2013].

Per essere funzionale, un *biomarker* deve essere specifico di una determinata componente bioaerosolica ed essere presente in quantità relativamente costante negli organismi di interesse.

I *biomarker* chimici non offrono direttamente la stima della concentrazione dell'organismo biologico più complesso di cui fanno parte, ma il valore di concentrazione ottenuto va correlato alla biomassa di interesse mediante un opportuno fattore di conversione. L'assegnazione dei corretti fattori di conversione è un passaggio molto delicato che può portare ad errori significativi.

L'uso di *biomarker* chimici, come strumento per la determinazione dei microrganismi, è una valida alternativa a metodi microbiologici classici, come la crescita in coltura e la conta delle specie al microscopio, che, come noto, sottostimano la componente microbica presente nel particolato aerodisperso [Pietrogrande et al. 2013].

1.3.1 Acido Muramico

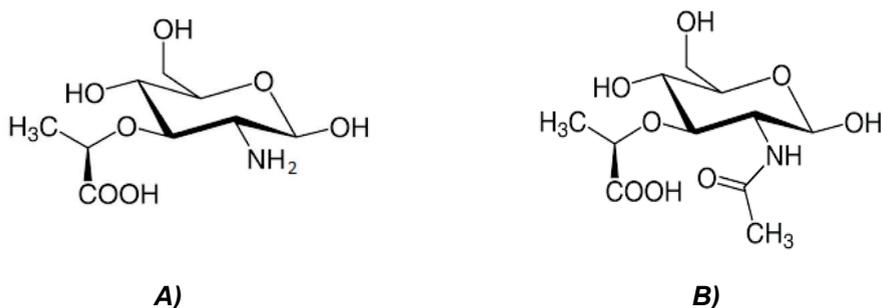


Figura 1: Struttura A) dell'acido muramico e B) dell'acido N-acetilmuramico (NAM)

L'acido muramico (MUR) (Fig. 1A) è un amminozucchero destrogiro che, in forma acetilata, NAM, (Fig. 1B) è presente nel peptidoglicano (PG), che compone la parete cellulare di batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi. Mentre i batteri Gram-negativi contengono percentuali basse di peptidoglicano (meno del 10% della parete cellulare totale) i Gram-positivi sono composti principalmente da peptidoglicano che solitamente costituisce il 30-70% della parete cellulare totale [Schleifer et al., 1972]. L'acido muramico è anche una sostanza biologicamente attiva, che influenza la risposta immunitaria cellulare [Schleifer et al., 1972].

Dal momento che l'acido muramico non si trova altrove in natura, può essere usato come indicatore specifico della presenza di PG e quindi di batteri in campioni ambientali [Fox et al., 1995].

Popham et al. (1996) riportano che il peptidoglicano è presente, in parte, anche nelle spore batteriche, anche se, in questo caso, generalmente, l'acido muramico viene convertito in lattame muramico.

1.3.2 Acido Dipicolinico

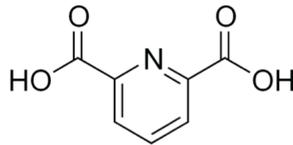


Figura 2: Struttura dell'acido dipicolinico

L'acido dipicolinico (DPA, acido piridin-2,6-dicarbossilico) (Fig. 2), è un acido dicarbossilico dalle proprietà chelanti e il cui potere chelante varia a seconda del pH. Il DPA è un composto assente nelle cellule vegetative, ma presente nelle spore batteriche come dipicolinato di calcio (Fig. 3), svolgendo diverse funzioni metaboliche. Identificato come estremamente importante per la resistenza e la stabilità delle spore, viene sintetizzato durante la sporulazione dei batteri e può essere considerato un indice della presenza di spore batteriche aerodisperse [Janssen et al., 1958; Taylor et al., 2009].

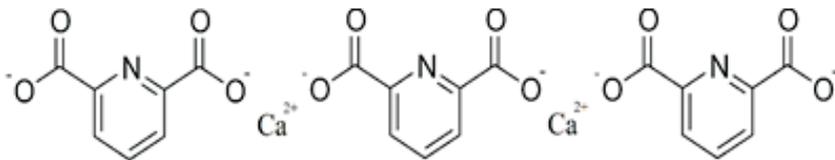


Figura 3: Struttura del dipicolinato di calcio

2. Determinazione della componente batterica del bioaerosol

Il Laboratorio Sicurezza delle Attività di Produzione e degli Insedimenti Antropici ha sviluppato un metodo per l'analisi qualitativa e quantitativa dei due *biomarker* precedentemente descritti, in campioni di materiale particolato collezionati in ambienti *outdoor* e lavorativi.

Sono state, pertanto, ottimizzate le metodiche di estrazione, purificazione, idrolisi e analisi mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa tandem (HPLC/MS-MS) con sorgente a *Ionizzazione Elettrospray* (ESI) dei due composti in esame.

Per la determinazione e/o conferma dei fattori di conversione, è stata effettuata l'analisi qualitativa e, tramite curve di calibrazione in solvente, l'analisi quantitativa dei due analiti in batteri e spore batteriche isolate e coltivate in laboratorio. Sono state inoltre costruite curve di calibrazione in matrice per l'analisi quantitativa dei due analiti estratti dal PM campionato.

I siti presi in esame sono stati un sito di *background* e un impianto di depurazione delle acque reflue, sito noto per essere una sorgente di aerosol microbico [Kowalski 2017; Korzeniewska 2011].

Tramite i fattori di conversione, si è quindi ottenuta la concentrazione batterica totale, come somma delle cellule e delle spore batteriche, presente nei luoghi monitorati.

2.1 Metodo analitico per la determinazione della componente batterica aerodispersa

2.1.1 Estrazione e purificazione

Batteri, spore batteriche e filtri campionati, immersi in 1 mL d'acqua, vengono sottoposti a 7 cicli di congelamento (1 ora a -20°C) e scongelamento in ultrasuoni (30 min a 60°C), ai fini della rottura delle membrane cellulari; dopo l'aggiunta di 100 mg di palline di vetro, i campioni subiscono 4 cicli di sonicazione (30 min) e vortex (2800 rpm per 30 min). Una aliquota (250 μl) della soluzione acquosa contenente l'acido dipicolinico viene conservata per la successiva analisi.

Sulla restante parte della soluzione acquosa, viene condotta un'idrolisi con HCl 6N per 3 ore ad una temperatura di 105°C e 170 rpm e successiva neutralizzazione con soluzione di NH_4OH (7,7 N).

La soluzione acquosa, dopo idrolisi, viene purificata su cartuccia SPE-C₁₈ preventi-

vamente attivata con 3 mL di acetonitrile e lavata con 3 mL di acqua. L'eluato, riunito con l'aliquota della soluzione acquosa pre-idrolisi, è poi evaporato in corrente d'azoto, ripreso con 50 μ L di acqua e filtrato. Tale soluzione è analizzata in cromatografia HPLC associata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-ESI-MS/MS) per la determinazione degli acidi dipicolinico e muramico.

2.1.2 Analisi in HPLC-ESI-MS/MS

La separazione cromatografica è stata condotta con una colonna ZIC-pHILIC a base polimerica (150 x 2,1 mm, 5 μ m) ed un'eluizione a gradino, utilizzando acqua ed acetonitrile come fasi mobili, aumentando rapidamente la percentuale del solvente più polare, l'acqua, come presentato in Tabella 1.

Tabella 1: Eluizione a gradino utilizzata nelle analisi HPLC/MS-MS

Tempo (min)	% Acqua	% Acetonitrile
0,00	5	95
0,10	40	60
2,00	40	60
2,10	65	35
10,00	65	35
10,10	5	95
40,00	5	95

In queste condizioni, l'acido dipicolinico e l'acido muramico sono eluiti con tempi di ritenzione, rispettivamente, di 7,6 e 8,6 minuti.

Per quanto riguarda l'acquisizione in massa, i migliori risultati in termini di intensità, di assenza di specie interferenti e di transizioni maggiormente significative sono stati ottenuti sia per l'acido dipicolinico che per il muramico in modalità negativa senza aggiunta di alcun additivo. I parametri strumentali e le transizioni utilizzati per le analisi in HPLC-ESI/MS-MS in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) sono riassunti in Tabella 2.

Tabella 2: Peso molecolare, ione precursore, transizione significativa e parametri strumentali per ogni analita di interesse

Parametri strumentali ottimizzati	Acido Dipicolinico	Acido Muramico
Peso Molecolare	167	251
Precursore (m/z) [M-H] ⁺	166	250
Transizione Significativa	166 --> 122	250 --> 89
Curtain gas (CUR)	10 psi	30 psi
Collision gas (CAD)	2.0 psi	2.0 psi
Ionspray voltage (IS)	-4500 V	-4000 V
Temperature (TEM)	350 ° C	350 ° C
Ion source GAS 1 (GS1)	30 psi	30 psi
Ion source GAS 2 (GS2)	40 psi	40 psi
Declustering Potential (DP)	-5 V	-10 V
Focusing Potential (FP)	-350 V	-350 V
Entrance Potential (EP)	-10 V	-10 V
Collision Energy (CE)	-10 V	-15 V
Collision cell Exit Potential (CXP)	-6 V	-7 V

Per entrambi gli acidi la transizione scelta è data dalla frammentazione dello ione deprotonato [M-H]⁻ - con la perdita della frazione glucidica, e la produzione dello ione [OCH(CH₃) COOH]⁻ - con m/z = 89 per l'acido muramico, e la perdita del frammento [COO]⁻; con produzione dello ione [M-44]⁻ con m/z= 122, per l'acido dipicolinico.

L'identificazione dei composti nei campioni reali si è basata su due criteri:

- 1) il tempo di ritenzione dell'analita non può differire più di $\pm 0,1$ min da quello standard;
- 2) in ciascun campione il rapporto tra lo ione qualificatore e lo ione *target* deve ricadere entro il 20% rispetto a quelli ottenuti per composti standard nelle stesse condizioni strumentali.

2.2 Analisi Quantitativa

2.2.1 Curve di calibrazione in solvente e con il metodo delle aggiunte standard

Gli acidi muramico e dipicolinico, estratti rispettivamente da batteri e spore batteriche, sono stati quantificati con il metodo dello standard esterno, dopo costruzione della curva di calibrazione in solvente costituito da una miscela di metanolo/acqua (1:1). Per l'analisi quantitativa degli acidi estratti da campioni di particolato atmosferico, a causa dell'effetto matrice dovuto alla grande quantità di

specie interferenti presenti, è stato necessario utilizzare il metodo delle aggiunte standard.

La curva di calibrazione in solvente è stata ottenuta iniettando soluzioni a concentrazione crescente di acido dipicolinico e muramico e riportando sulle ordinate (asse y) le aree del segnale cromatografico di ogni analita e sulle ascisse (asse x) le concentrazioni dello standard. Dai valori del coefficiente di correlazione R² ottenuti, pari a 0,9943 per DPA e 0,9970 per MUR, risulta una buona linearità nell'intervallo di concentrazione esaminato.

Per la costruzione delle curve di calibrazione con il metodo delle aggiunte standard il campione estratto è stato diviso in quattro aliquote. Una aliquota è stata analizzata tal quale, le altre tre aliquote sono state analizzate dopo aver aggiungendo a 45 µL di campione 5 µL di soluzioni di STD a concentrazione di 2,5, 5 e 10 µg/mL. Sono quindi state riportate sulle ordinate (asse y) le aree del segnale cromatografico di ogni analita e sulle ascisse (asse x) le concentrazioni dello standard aggiunto. L'intersezione della retta ottenuta con il metodo dei minimi quadrati con l'asse delle ascisse negativo indica la concentrazione degli analiti di interesse presenti nel campione ambientale.

2.2.2 Qualità del dato

Nella Tabella 3 sono riportati la precisione, in termini di ripetibilità *inter-* ed *intra-day*, il recupero e i limiti di rivelabilità (LOD, *limit of detection*) e di quantificazione (LOQ, *limit of quantification*) dei due analiti indicatori di batteri e spore batteriche [ICH 2005].

Tabella 3: Ripetibilità, recuperi, LOD e LOQ dei tre analiti

COMPOSTO	Ripetibilità intra-day (RSD)	Ripetibilità inter-day (RSD)	Recupero (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Acido Dipicolinico	6,2	12	77	20	60
Acido Muramico	0,33	2,3	80	6,0	18

Il LOD e il LOQ sono stati determinati iniettando soluzioni sempre più diluite degli analiti di interesse fino ad ottenere un valore di concentrazione tale da produrre un segnale rispettivamente tre e dieci volte superiore al rumore di fondo.

La ripetibilità *intra-day* è stata calcolata analizzando nello stesso giorno, ad intervalli di tempo regolari, una soluzione standard di tutti gli analiti. La ripetibilità *inter-day* è stata ottenuta facendo analisi delle medesime soluzioni in 5 giorni consecutivi. I valori sono stati espressi come deviazione standard relativa (RSD).

Il recupero è stato calcolato sottoponendo all'intera procedura, in parallelo, tre soluzioni acquose addizionate a monte con una soluzione multistandard degli analiti in esame ad una concentrazione nota, e altre tre soluzioni acquose in cui lo stesso multistandard è stato aggiunto a valle, dopo processo estrattivo e purificazione, poco prima dell'iniezione in HPLC-MS/MS. Il recupero è stato calcolato come rapporto percentuale tra la media dei tre segnali analitici ottenuti a monte e quella dai tre segnali analitici ottenuti a valle.

2.3 Fattori di Conversione della quantità di *biomarker* in massa batterica

Poiché gli acidi dipicolinico e muramico non si trovano altrove in natura, la loro determinazione in campioni ambientali può essere utilizzata per una stima indiretta di batteri e spore batteriche, tramite opportuni fattori di conversione.

Nell'ambito del presente studio, tali fattori sono stati calcolati campionando, isolando e coltivando diverse specie batteriche, sia Gram-positive che Gram-negative.

I batteri isolati erano *Bacillus Cereus*, *Bacillus Megaterium*, *Bacillus Mycoides*, *Bacillus Simplex*, *Bacillus Subtilis* per i Gram-positivi, *Escherichia Coli* e *Pseudomonas Aeruginosa* per i Gram-negativi, mentre le spore batteriche erano di *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Mycoides* e *Bacillus Megaterium*. Cellule vegetative e non sono state sottoposte alla procedura di cui al paragrafo 2.1, per la determinazione quantitativa dei relativi *biomarker* e il calcolo dei fattori di conversione.

2.3.1 Cellule Batteriche

Per l'analisi delle cellule batteriche, 1 mg di batterio è stato disperso in 1 mL di acqua e sottoposto alla procedura di Paragrafo 2.1.

In tabella 4 sono riportati i ng di acido muramico per mg di batterio e la sua percentuale (p/p) determinata in ogni specie analizzata; nell'ultima colonna è riportata la media delle percentuali (p/p) per le specie Gram-positive e Gram-negative. I risultati ottenuti, così come la forte variabilità evidenziata tra le singole specie, sono comparabili con quanto riportato in letteratura.

Fox et al. (1995) riferiscono una percentuale di acido muramico variabile da 0,29 % a 1,97 % del peso secco dei batteri presi in esame con i valori più bassi attribuibili ai Gram-negativi. Mielniczuk et al. (1995) riportano un contenuto medio di acido muramico per mg di peso secco di tre specie batteriche Gram-negative (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Proteus Mirabilis*) pari a 0,63%, 0,14% e 0,95%, rispettivamente. Infine, Black et al. (1994) ottengono valori medi per i batteri Gram-positive e Gram-negativi rispettivamente pari allo 0,49% e 0,29% di acido muramico rispetto al peso secco dei batteri considerati.

Tabella 4: Ripetibilità, recuperi, LOD e LOQ dei tre analiti

Classificazione tassonomica		Acido Muramico (MUR)		
		ng/mg	%	MEDIA (%)
Gram-Positivi	Bacillus Mycoides	2,2×10 ³	0,23	0,69
	Bacillus Subtilis	6,1×10 ³	0,61	
	Bacillus Simplex	1,1×10 ⁴	1,1	
	Bacillus Megaterium	9,0×10 ³	0,90	
	Bacillus Cereus	6,4×10 ³	0,64	
Gram-Negativi	Escherichia Coli	3,8×10 ³	0,38	0,28
	Pseudomonas Aeruginosa	1,9×10 ³	0,19	
FATTORE DI CONVERSIONE				0,61

Dal momento che i batteri Gram-positivi e Gram-negativi non sono equamente distribuiti in atmosfera [Shaffer et al. 1997, Fang et al. 2007], partendo dalla percentuale (p/p) media di acido muramico misurato nei batteri Gram-positivi e negativi e tenendo conto della rispettiva abbondanza percentuale (80% per i Gram-positivi e 20% per i Gram-negativi), il fattore di conversione è stato ottenuto come media pesata ed è risultato pari a 0,61%.

2.3.2 Spore Batteriche

1 mg di spore batteriche è stato disperso in 1 mL di acqua e sottoposto alla procedura di cui al paragrafo 2.1, omettendo i passaggi di idrolisi e purificazione su cartuccia SPE. Infatti, dal momento che l'acido dipicolinico si trova nel *core* della spora batterica, è stato verificato sperimentalmente che la sola rottura delle pareti cellulari è sufficiente per portarlo in soluzione. Nel caso delle spore batteriche quindi, la soluzione acquosa pre-idrolisi viene iniettata dopo semplice filtrazione. In tabella 5 è riportata la quantità di acido dipicolinico, espressa sia in ng di acido per mg di spora batterica che come percentuale (p/p) determinata in ogni specie analizzata e la percentuale media tra le specie.

Per il calcolo del fattore di conversione dell'acido dipicolinico in spore batteriche sono state prese in considerazione soltanto specie batteriche Gram-positive, le uniche che, in condizioni di vita sfavorevoli, sono capaci di dar luogo alla formazione di spore sopravvivendo in uno stato di quiescenza.

Dalla media aritmetica effettuata tra le percentuali di acido dipicolinico determinate nelle singole specie considerate, è risultato che circa il 10% del peso secco delle spore batteriche è rappresentato dall'acido dipicolinico ma, in accordo con la letteratura, con una forte variabilità tra le singole specie prese in esame.

Tabella 5: ng di acido dipicolinico per mg di spora batterica e percentuale (p/p) misurati nelle singole specie batteriche e percentuale (p/p) media

Classificazione tassonomica		Acido Dipicolinico	
		ng/mg	%
Gram-Positivi	Bacillus Mycoides	4,7×10 ⁴	4,7
	Bacillus Subtilis	1,4×10 ⁵	15
	Bacillus Megaterium	9,3×10 ⁴	9,3
FATTORE DI CONVERSIONE		MEDIA	9,7

Molti studi, infatti, riportano una quantità di DPA pari a circa 8-15% del peso secco delle spore [Powell 1953, Hindle et al. 1999, Fichtel et al., 2007] [Warth et al., 1971; Hindle et al., 1999] fino ad un massimo del 25% [Paidhungat et al. 2001]. Huang et al. (2007) evidenziano che il contenuto di DPA per peso secco di spora può variare anche con la quantità di nutrienti aggiunti durante lo sviluppo delle spore.

2.4 Quantità di batteri e spore batteriche in campioni di materiale particolato

2.4.1 Campionamento

Campioni ambientali di materiale particolato aerodisperso sono stati collezionati durante la primavera 2018 utilizzando una pompa SKC *Legacy*, che opera ad un flusso di 10 L min⁻¹, per la raccolta della frazione toracica del materiale particolato (PM₁₀) su filtri di teflon da 47 mm di diametro. I campionamenti sono stati effettuati in due diversi siti: nei pressi di Montelibretti, sito semi-rurale a 25 km a nord-est di Roma, e in un impianto di depurazione di acque reflue (WWTP) posto all'interno di una zona urbana del centro Italia.

Mentre il sito di Montelibretti è stato scelto come sito di *background*, in quanto non esposto a sorgenti specifiche di bioaerosol, l'impianto di trattamento delle acque reflue rappresenta un sito in cui i lavoratori possono essere esposti a bioaerosol per contatto diretto con i materiali contaminati e/o per inalazione di microrganismi aerosolizzati durante le diverse fasi del processo di trattamento delle acque.

Nel sito WWTP, in parallelo al campionamento effettuato con la pompa SKC *Legacy*, è stata collezionata la frazione inalabile del materiale particolato (PM₁₀₀) con un campionatore Button Aerosol Sampler (SKC, Inc.) associato ad una pompa Universale SKC Deluxe (224-PCEX8), dotata di flussimetro.

In tabella 6 sono riassunti i dati dei campionamenti effettuati e le concentrazioni (µg/m³) di PM₁₀ ottenute nei due siti; per il solo sito WWTP sono riportati anche i dati relativi alla frazione inalabile (PM₁₀₀).

La concentrazione di PM₁₀ misurata nella zona semi-rurale del sito di Montelibretti è leggermente inferiore rispetto a quella misurata nel sito WWTP che, trovandosi all'interno di un'area urbana, è più influenzato da emissioni antropogeniche.

Tabella 6: Tabella riassuntiva dei due siti di campionamento (Da = diametro aerodinamico)

SITO	Da (µm)	PM (mg)	Aria Campionata (m ³)	µg/m ³
Montelibretti	< 10	4,15	214	19,4
WWTP	< 10	1,95	84	23,2
	<100	0,098	2,8	35

Parallelamente al campionamento di materiale particolato destinato all'analisi degli indicatori chimici, nei due siti è stato effettuato anche un campionamento di PM per la determinazione quantitativa delle sole specie *viabile* mediante tecniche di microbiologia classica. Tale procedura prevede la deposizione dei filtri campionati su specifici terreni di coltura e la successiva conta al microscopio delle Unità Formanti Colonia (CFU).

2.4.2 Risultati

I filtri campionati sono stati trattati secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.1 e le quantità (ng) dei due *biomarker*, acido muramico (MUR) e acido dipicolinico (DPA) sono state ottenute utilizzando il metodo delle aggiunte standard (vedi par. 2.2.1). Tramite i fattori di conversione riportati nelle tabelle 4 e 5, è stato possibile ottenere le quantità di batteri e spore batteriche presenti nei campioni analizzati. Le concentrazioni atmosferiche e le percentuali peso/peso di batteri e spore batteriche nelle frazioni del materiale particolato collezionato (tabella 7) sono state calcolate dividendo la quantità di batteri e spore batteriche per il volume di aria campionata (ng/m³) e per la quantità di materiale particolato totale di ciascun campione (% p/p).

Tabella 7: Concentrazione atmosferica e percentuale p/p di batteri e spore batteriche nelle frazioni di PM di ciascun campione

	Da (μm)	Batteri ng/m^3	Spore ng/m^3	Batteri % p/p	Spore % p/p
Montelibretti	<10	25,6	26,2	0,13	0,14
	<100	---	---	---	---
WWTP	<10	208	75	1,9	0,7
	<100	944	199	2,7	0,56

Per il solo sito WWTP, dove è stato effettuato il campionamento anche della frazione inalabile del materiale particolato, la figura 4 riporta il confronto della concentrazione di batteri e spore batteriche nelle frazioni di PM minore di 10 μm e compresa tra 10 e 100 μm .

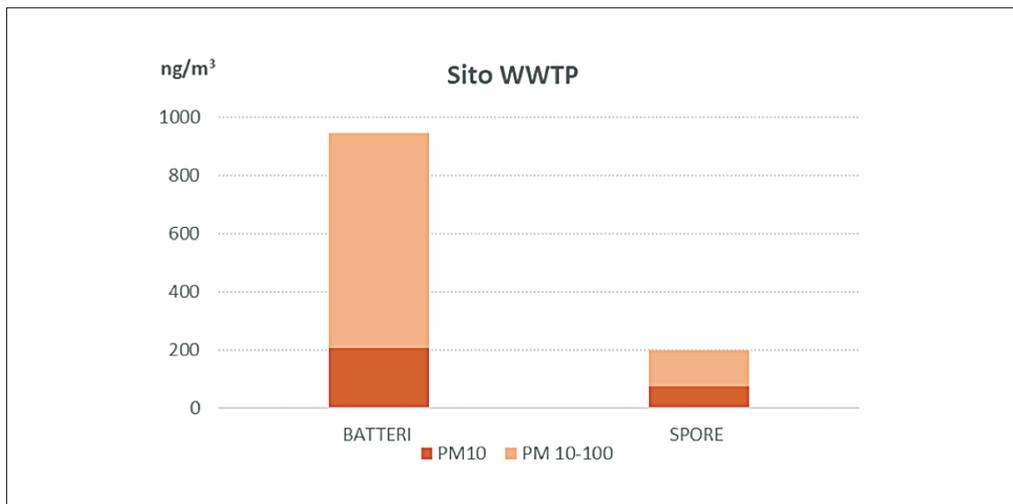


Figura 4: Concentrazioni atmosferiche di batteri e spore nel sito WWTP nelle due frazioni granulometriche (PM_{10} e PM_{10-100})

Entrambe le concentrazioni, ma in misura maggiore la concentrazione di cellule batteriche, sono risultate essere più alte nella frazione di particolato con diametro aerodinamico maggiore di 10 μm . Questo è in accordo con il fatto che in atmosfera le cellule batteriche si trovano prevalentemente aggregate come *cluster* o biofilm che ne garantiscono una maggiore sopravvivenza e che vengono quindi campionate nelle frazioni più grossolane del particolato [Benner et al. 2003].

In tabella 8 è riportato il numero di cellule e spore batteriche su volume di aria campionata (cell/m^3 o spore/m^3) calcolato dai dati di tabella 7 approssimando il peso medio di cellule e spore batteriche rispettivamente a 1 pg e 0,6 pg [Davis et al. 1973].

Tabella 8: Numero di cellule e spore batteriche per m^3 e concentrazione batterica ottenuta mediante conta al microscopio (CFU/m^3) nel PM_{10} dei due siti di campionamento

$\text{N}^\circ/\text{m}^3$	Montelibretti	WWTP
Cellule Batteriche	$2,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$
Spore	$4,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$
CFU	201	520

Le quantità di batteri totali e spore batteriche per m^3 rilevate nel PM_{10} sono paragonabili con quanto riportato in letteratura: da $1,1 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^4$ batteri/ m^3 per siti rurali, $0,5 \times 10^4$ batteri/ m^3 per un sito remoto [Harrison et al. 2005, Bauer et al. 2002] e fino a 10^7 - 10^9 batteri/ m^3 in impianti di trattamento delle acque reflue, in funzione delle diverse fasi di trattamento [Laitinen et al.1992].

In tabella 8 è mostrata anche la concentrazione di batteri *viable* ottenuta mediante conta al microscopio ed espressa in CFU/m^3 , che risulta in accordo, per entrambi i siti, con quanto riportato in letteratura [Fang et al. 2007; Orsini et al. 2002; Madsen et al. 2009].

Pur non esistendo specifiche normative sulle concentrazioni batteriche ammesse nei luoghi di lavoro, i valori di CFU/m^3 riportati in tabella 8 per il sito WWTP risultano minori del valore soglia di batteri aerodispersi ($1000 \text{CFU}/\text{m}^3$) raccomandato dall'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) [Li et al., 2013].

L'impianto di depurazione (WWTP) ha mostrato, come atteso, una concentrazione di batteri e spore batteriche maggiore rispetto al sito rurale di Montelibretti. Il più elevato carico microbico rilevato nel sito WWTP è dovuto sia alle emissioni legate ai processi biologici attivi nell'impianto sia al fatto che l'impianto è situato in una zona fortemente antropizzata. Questo tipo di aree sono infatti riconosciute come sorgenti della componente batterica del particolato [Després et al 2007, Després et al. 2012, Burrows 2009].

In figura 5 è riportato il confronto fra la concentrazione di batteri *viable*, analizzati mediante metodi microbiologici ed espressi in CFU/m^3 , e la concentrazione batterica totale (batteri + spore batteriche) ottenuta mediante analisi chimica dei *bio-marker* ed espressa in numero di cellule/ m^3 .

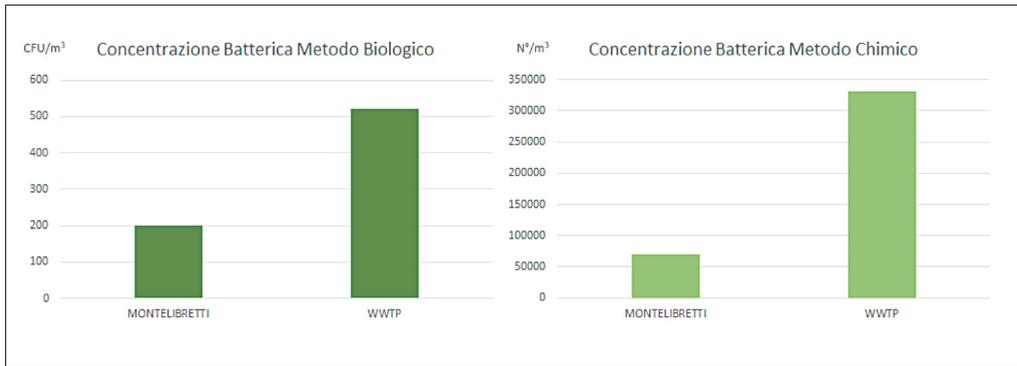


Figura 5: Confronto fra concentrazione di batteri totali e concentrazione di batteri viable nel PM₁₀ dei due siti di campionamento

Dai dati riportati in figura 5, risulta evidente come la concentrazione batterica calcolata con il metodo chimico sia notevolmente superiore rispetto a quella ottenuta con il metodo microbiologico classico [Laitinen et al.1992]. Il metodo chimico permette, infatti, di rilevare anche le specie non vitali, le specie non coltivabili e loro frammenti [Benner et al. 2003]. Il metodo chimico può quindi essere utilizzato per colmare alcune lacune del metodo biologico, che rimane comunque l'unico in grado di individuare la presenza di specie microbiche patogene.

3. Conclusioni

Nonostante negli ultimi anni sia aumentato il numero delle attività lavorative soggette a rischio biologico (riciclaggio dei rifiuti, industrie di compostaggio, aziende zootecniche, agricole, biotecnologiche, ecc.), non sono ancora stati stabiliti limiti di esposizione agli agenti biologici, né si hanno sufficienti informazioni sulla relazione dose-risposta. Questo a causa della mancanza di metodi efficaci per misurare quantitativamente gli agenti biologici.

Le metodologie ad oggi principalmente utilizzate si basano, infatti, sulla coltivazione delle specie *viable* e successiva conta al microscopio. In questo modo vengono escluse tutte le specie non vitali e vitali, ma non coltivabili, che possono tuttavia essere la causa specifica di allergie ed altre patologie dell'apparato respiratorio.

Pertanto, in mancanza di metodi di monitoraggio standardizzati e allo scopo di dare un'informazione quantitativa della componente batterica totale (*viable* e non *viable*, coltivabile e non coltivabile), il presente lavoro propone un metodo di estrazione ed analisi, da campioni di materiale particolato, degli acidi muramico e dipicolinico come indicatori della presenza, rispettivamente, di batteri e spore batteriche aerodisperse.

Il metodo messo a punto dal Laboratorio Sicurezza delle Attività di Produzione e degli Insediamenti Antropici del DIT può essere considerato uno strumento efficace per monitorare l'andamento e le variazioni delle concentrazioni di batteri e spore batteriche aerodisperse in diverse realtà lavorative, sia *outdoor* che *indoor*. I risultati così ottenuti possono fornire informazioni utili a ridurre l'esposizione dei lavoratori migliorando la salubrità dei luoghi di lavoro esaminati.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la professoressa Daniela Uccelletti del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin" dell'Università "La Sapienza" di Roma, per la cultura delle cellule e spore batteriche utilizzate nel presente studio.

BIBLIOGRAFIA

Amato P., Menager M., Sancelme. M., Laj P., Mailhot G., Delort A.M. 2005. Microbial population in cloud water: implications for the chemistry of clouds. *Atmospheric Environment*, 39, 4143-4153.

Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzenberger R., Zibuschka F., Puxbaum H. 2002. The contribution of bacterial and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmospheric Research*, 64, 109-119.

Benner R. and Kaiser K. (2003) "Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter" *Limnol. Oceanogr.*, vol. 48, n. 1, pag. 118-128

Beverly M. B, Voorhees K. J, Hadfield T. L, Cody R. B. 2000. Electron monochromator mass spectrometry for the analysis of whole bacteria and bacterial spores. *Analytical Chemistry*, 72, 2428-2432.

Biomarkers Definitions Working Group. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69, 3, 89-95.

Black G.E., Fox A., Fox K., Snyder A.P., Smith P.B.W. 1994. Electrospray Tandem Mass Spectrometry for analysis of native muramic acid in whole bacterial cell hydrolysates. *Analytical Chemistry*, 66, 23, 4171-4176.

Blais-Lecours P., Perrott P., Duchaine C. 2015. Non-culturable bioaerosols in indoor settings: Impact on health and molecular approaches for detection. *Atmospheric Environment*, 110, 45-53.

Borodulin A.I., Safatov A.S., Shabanov A.N., Yarygin A.A., Khutorova O.G., Belan B.D., Panchenko M.V. 2005. Physical characteristics of concentration fields of tropospheric bioaerosols in the South of Western Siberia. *Aerosol Science*, 36, 785-800.

Brodie E.L., De Santis T.Z., Moberg Parker J.P., Zubietta I.X., Piceno Y.M., Andersen G.L. 2007. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 1, 299-304.

Buiarelli F., Canepari S., Di Filippo P., Perrino C., Pomata D., Riccardi C., Speziale R. 2013. Extraction and analysis of fungal spore biomarkers in atmospheric bioaerosol by HPLC-MS-MS and GC-MS. *Talanta*, 105, 142-151.

Buiarelli F., Gallo V., Di Filippo P., Pomata D., Riccardi C. 2013. Development of a method for the analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application on Standard Reference Material 1649a (urban dust). *Talanta*, 115, 966-972.

Burrows S. M., Elbert W., Lawrence M. G., U. Pöschl. 2009. Atmospheric bacteria in different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 9, 10777-10827.

Casareto B.E., Suzuki Y., Okada K., Morita M. 1996. Biological micro-particles in rain water. *Geophysical Research Letters*, 23, 173-176.

Davis B., Dulbecco R., Eisen H., Ginsberg H. 1973. *Bacterial physiology: microbiology*, 2nd ed., Maryland: Harper and Row, 96-97.

Després V. R., Nowoisky J. F., Klose M., Conrad R., Andreae M. O., and Pösch U. 2007. Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. *Biogeosciences*, 4, 1127-1141.

Després V.R., Huffman J.A., Burrows S.M., Hoose C., Safatov A.S., Buryak G., Fröhlich-Nowoisky J., Elbert W., Andreae M.O., Pöschl U., Jaenicke R. 2012. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, 64, 1, 1-58.

Di Filippo P., Pomata D., Riccardi C., Buiarelli F., Perrino C. 2013. Fungal contribution to size-segregated aerosol measured through biomarkers. *Atmospheric Environment*, 64, 132-140.

Di Filippo P., Pomata D., Riccardi C., Buiarelli F., Gallo V., Quaranta A. 2014. Free and combined amino acids in size-segregated atmospheric aerosol samples. *Atmospheric Environment*, 98, 178-189.

Di Filippo P., Riccardi C., Pomata D., Buiarelli F. 2016. "Procedura sperimentale per la determinazione di spore fungine in atmosfera". *Quaderno Tecnico INAIL*. ISBN 978-88-7484-521-7.

Di Filippo P., Pomata D., Riccardi C., Buiarelli F., Uccelletti D., Zanni E. 2017. Muramic and dipicolinic acids in atmospheric particulate matter as biomarkers of bacteria and bacterial spores. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 1657-1666.

Douwes J., Thorne P., Pearce N., Heederik D. Review. 2003. Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, 47, 3, 187-200.

- Fang Z., Ouyang Z., Zheng H., Wang X., Hu L. 2007. Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing, China. *Microbial Ecology*, 54, 3, 487-496.
- Fichtel J., Köster J., Rullkötter J., Sass H. 2007. Spore dipicolinic acid contents used for estimating the number of endospores in sediments. *FEMS, Microbiology Ecology*, 61, 522-532.
- Fox A., Wright L., Fox K. 1995. Gas chromatography-tandem mass spectrometry for trace detection of muramic acid, a peptidoglycan chemical marker, in organic dust. *Journal of Microbiological Methods*, 22, 11-26.
- Harrison R.M., Jones A.M., Biggins P.D.E., Pomeroy N., Cox C.S., Kidd S.P., Hobman J.L., Brown N.L., Beswick A. 2005. Climate factors influencing bacterial count in background air samples. *International Journal of Biometeorology*, 49, 167-178.
- Hejkal T.W., Larock P.A., Winchester J.W. 1980. Water-to-air fractionation of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 2, 335-338.
- Hindle A.A., Hall E.A.H. 1999. Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst*, 124, 1599-1604.
- Huang S. S., Chen D., Pelczar P. L., Vepachedu V. R., Setlow P., Li Y. Q. 2007. Levels of Ca²⁺-Dipicolinic Acid in Individual Bacillus Spores Determined Using Microfluidic Raman Tweezers. *Journal of Bacteriology*, 189, 13, 4681-4687.
- Kellogg C.A., Griffin D.W., Garrison V.H., Peak K.K., Royall N., Smith R.R., Shinn E.A. 2004. Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali. West Africa. *Aerobiologia*, 20, 99-110.
- Korzeniewska, E. 2011. Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - A review. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*, 1, 3, 393-407.
- Kowalski M., Wolany J., Pastuszka J. S., Płaza G., Wlazło A., Ulfig K., Malina A. 2017. Characteristics of airborne bacteria and fungi in some Polish wastewater treatment plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 2181-2192.
- Jaenicke R. 2005. Abundance of Cellular Material and Proteins in the Atmosphere. *Science*, 308, 73, 5718.
- Janssen F.W., Lund A.J., Anderson L.E. 1958. Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. *Science*, 127, 3288, 26-27.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).

Laitinen S., Nevalainen A., Kotimaa M., Liesivuori J., Martikainen P.J. 1992. Relationship between bacterial counts and endotoxin concentrations in the air of wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 11, 3774-3776.

Lappalainen M.H.J., Roponen M., Hyvarinen A., Nevalainen A., Laine O., Pekkanen J., Hirvonen M.R. 2008. Exposure to environmental bacteria may have differing effects on tumour necrosis factor- α and interleukin-6-producing capacity in infancy. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 1483-1492.

Li Y., Yang L., Meng Q., Qiu X., Feng Y. 2013. Emission Characteristics of Microbial Aerosols in a Municipal Sewage Treatment Plant in Xi'an, China. *Aerosol and Air Quality Research*, 13, 343-349.

Lindemann J., Uppel C.D. 1985. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 5, 1229-1232.

Lighthart, B. 1997. The ecology of bacteria in alfresco atmosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 23, 263-274.

Linee Guida Contarp 2010. Anzidei P., Frusteri L., Giovinazzo R., Venanzetti F., Guerrera E., Sarto D. Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi.

Madsen A. M., Schlünssen V., Olsen T., Sigsgaard T., Avci H. 2009. Airborne Fungal and Bacterial Components in PM₁ Dust from Biofuel Plants. *Annals of Occupational Hygiene*, 53, 7, 749-757.

Mancinelli R., Shulls W.A. 1978. Airborne Bacteria in an Urban Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 6, 1095-1101.

Matthias-Maser S., Brinkmann J., Schneider W. 1999. The size distribution of marine atmospheric aerosol with regard to primary biological aerosol particles over the South Atlantic Ocean. *Atmospheric Environment*, 33, 3569-3575.

Matthias-Maser S., Jaenicke R. 2000. The size distribution of primary biological aerosol particles in the multiphase atmosphere. *Aerobiologia*, 16, 207-210.

Mielniczuk Z., Mielniczuk E., Larsson L. 1995. Determination of muramic acid in organic dust by gaschromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 670, 167-172.

- Orsini M., Laurenti P., Boninti F., Arzani D., Ianni A., Romano-Spica V. 2002. A molecular typing approach for evaluating bioaerosol exposure in wastewater treatment plant workers. *Water Research*, 36, 1375-1378.
- Paidhungat M., Setlow B., Setlow A.D.P. 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, 82, 19, 5505-5512.
- Peccia J., Milton D.K., Tiina L., Hill J. 2008. A Role for Environmental Engineering and Science in Preventing Bioaerosol Related Disease. *Environmental Science & Technology*, 42, 13, 4631-4637.
- Perrino C., Marcovecchio F. 2016. A new method for assessing the contribution of Primary Biological Atmospheric Particles to the mass concentration of the atmospheric aerosol. *Environment International*, 87, 108-115.
- Pietrogrande M.C., Bacco D., Chiereghin S. 2013. GC/MS analysis of water-soluble organics in atmospheric aerosol: optimization of a solvent extraction procedure for simultaneous analysis of carboxylic acids and sugars. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 1095-1104.
- Popham D.L., Helin J., Costello C.E., Setlow P. 1996. Muramic lactam in peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat resistance, *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences - Microbiology - USA*, 93, 15405-15410.
- Powell J. F. 1953. Isolation of Dipicolinic Acid (Pyridine-2:6-dicarboxylic Acid) from Spores of *Bacillus megatherium*, *Biochemical Journal*, 54, 2, 210-211.
- Prescott L., Harley, J. Klein D. 2002. Prokaryotic cell structure and function. *Microbiology*. Fifth Edition, 41-73. McGraw Hill.
- Qian J., Hospodsky D., Yamamoto N., Nazaroff W. W., Peccia J. 2012. Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom. *Indoor Air*, vol. 2, 4, 339-351.
- Sattler B., Puxbaum H., Psenner R. 2001. Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters*, 28, 2, 239-242.
- Sawyer B., Rao K.C., O'Brien P., Elenbogen G., Zenz D.R., Lue-Hing C. 1996. Changes in bacterial aerosols with height above aeration tanks. *Journal of Environmental Engineering*, 122, 368-373.
- Schleifer K.H., Kandler O. 1972. Peptidoglycan. Types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36, 4, 407-477.

Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 514-525.

Shaffer B.T., Lighthart B. 1997. Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest, and coastal. *Microbial Ecology*, 34, 167-177.

Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., Greenberg E. P. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407, 762-764.

Taylor K.M.L., Lin W. Hybrid silica nanoparticles for luminescent spore detection. 2009. *Journal of Materials Chemistry*, 19, 6418-6422.

Wady L., Shehabi A., Szponar B., Pehrson C., Sheng Y., Larsson L. 2004. Heterogeneity in microbial exposure in schools in Sweden, Poland and Jordan revealed by analysis of chemical markers. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 14, 293-299.

Warth A.D., Strominger J.L. 1971. Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 10, 24, 4349-4358.

Zucker B.A. and Müller W. 2004. Airborne endotoxins and Gram-Negative bacteria in a residential neighborhood. *Water, Air, and Soil Pollution*, 158, 1, 67-75.

