Allegato 2

Determinazione quantitativa delle concentrazioni di fibre di amianto aerodisperse in ambienti indoor

A) Microscopia ottica in contrasto di fase (MOCF)

1A) Procedura per campionamento e analisi:

a) Filtri di prelievo: esteri misti di cellulosa, da 25 mm di diametro grigliati, con porosità tra 0,8 e 1,2 micrometri (μm).

b) Portafiltri: metallici con estensione metallica oppure in materiale plastico conduttore.

c) Supporto cellulosico: su di esso deve essere posto il filtro di campionamento (pad).

d) Flusso di prelievo: il flusso può variare fra 1 l/min e 12 l/min, deve essere costante durante tutto il tempo di campionamento, controllato all'inizio e alla fine di ogni prelievo e mantenuto entro ± 10%. Per ridurre i tempi di campionamento può essere utilizzato un flusso più alto senza per altro inficiare l'efficienza di campionamento.

e) Volume da prelevare: deve essere di almeno 480 litri o maggiore. Il campionamento dovrebbe assicurare almeno una densità di fibre sul filtro vicina alle 20 ff/mm^2 (vedi punto m). Nel caso in cui il filtro di campionamento sia troppo carico di particolato si possono prelevare, in parallelo o in sequenza, due campioni da almeno 240 litri ciascuno.

f) Preparazione del campione (vetrini): la procedura è descritta nel metodo indicato dalla *Dir. 83/477/CEE* (4); (vapori di acetone e triacetina). Per diminuire il tempo necessario alla completa diafanizzazione, dopo la applicazione della triacetina (normalmente di ca. 24 ore), si può scaldare il preparato (vetrino più coprioggetto) per 15 minuti a circa 50 °C su una piastra riscaldante.

g) Campi microscopici da esaminare: devono essere 200 per un campione di 480 litri (nel caso di due campioni da 240 litri ciascuno posti a ca. 4 metri di distanza, si esaminano 200 campi ciascuno ed il risultato si riporta a 480 litri e 200 campi). Quando si è potuto prelevare un volume d'aria maggiore di 480 litri (fino ad un massimo di 2000 litri) può essere ridotto il numero di campi da esaminare. Un campo microscopico corrisponde all'area reticolo di Walton-Beckett (a 500 × è 0.00785 mm^2).

h) Criteri di conteggio per la MICROSCOPIA OTTICA IN CONTRASTO DI FASE: criteri descritti nella *Dir. 83/477/CEE* (5).

(NOTA: Questi criteri impongono di considerare qualunque particella di forma allungata avente lunghezza > 5 μm, diametro < 3 μm e rapporto lunghezza/diametro > 3:1; tuttavia in molti casi un analista esperto può distinguere, sulla base di caratteristiche morfologiche specifiche, o usando filtri polarizzatori incrociati, particelle allungate non di amianto. In tal caso occorre riportare in dettaglio sia il numero di fibre totali conteggiate, sia il numero di fibre non ritenute di amianto, indicando i criteri distintivi impiegati).

l) Filtri bianchi: uno ogni 25 filtri usati (batch) oppure almeno il 10% del totale dei filtri usati per l'insieme dei campionamenti. Il valore del numero di fibre riscontrate in un numero di campi eguali

a quello esaminato nei campioni non deve mai superare 3 fibre, in caso contrario si deve presumere una sorgente di contaminazione che occorrerà individuare ed eventualmente scartare l'intero set di filtri.

m) Variabilità del metodo: nell'ambito di un laboratorio che esegue continuativamente analisi di campioni applicando il metodo del filtro a membrana per le fibre di amianto, è stato sperimentalmente riscontrato un coefficiente di variazione (CV) intralaboratorio che può essere rappresentato dalla relazione:

$$CV = \sqrt{\left[N + (0.2 \cdot N)^2\right]} / N$$

dove N = numero fibre trovate nel numero di campi ispezionati. Il limite fiduciario superiore (LFS) e inferiore (LFI) nel caso di campioni con densità di fibre inferiore a ca. 20 ff/mm^2 possono essere calcolati dalle seguenti relazioni:

$LFI = N - 1{,}3 \cdot CV \cdot N$

$LFS = N + 2{,}3 \cdot CV \cdot N$

n) Calcolo della concentrazione C:

$C\ (ff/litro) = [10^6 \cdot N \cdot D^2] / [V \cdot n \cdot d^2]$

dove:

N =n. di fibre contate in totale (su un solo filtro o su 2 filtri);
n =n. di campi del reticolo esaminati su un solo filtro (200 o meno in funzione del volume totale prelevato);
D =n mm, diametro effettivo del filtro (filtro da 25 mm di diametro);
d =in micron, è il diametro del reticolo di Walton Beckett (100 micrometri);
V =in litri, il volume di aria prelevato (su un solo filtro o su due filtri).

o) Presentazione dei risultati: in aggiunta al dato di concentrazione, per ogni campione deve essere allegato il rispettivo modulo di conteggio rigorosamente completo in ogni sua parte, e sottoscritto dall'analista.

2A) *Direttiva 83/477/CEE* (6) - Metodo di riferimento per le misurazioni del tenore dell'amianto nell'aria nel luogo di lavoro:

a) I campioni sono prelevati nella zona di respirazione dei singoli lavoratori: cioè entro una semisfera di 300 mm di raggio che si estende dinanzi alla faccia del lavoratore e misurata a partire dal punto di mezzo di una linea congiungente le sue orecchie.

b) Si usano filtri a membrana (esteri misti di cellulosa o nitrato di cellulosa) di porosità tra 0,8 e 1,2 µm con reticolo stampato e con diametro di 25 mm.

c) Si usa un portafiltro a faccia aperta provvisto di cappuccio metallico cilindrico, estendentesi tra 33 mm e 44 mm davanti al filtro e che permetta l'esposizione di un'area circolare di almeno 20 mm di diametro. Durante l'uso il cappuccio è rivolto verso il basso.

d) Si usa una pompa portatile a batteria, portata sulla cintura o in una tasca del lavoratore. Il flusso deve essere esente da pulsazioni e la portata regolata inizialmente a 1 l/min ± 5%. Durante il periodo di campionamento la portata è mantenuta entro ± 10% della portata iniziale.

e) Il tempo di campionamento è misurato con una tolleranza del 2%.

f) Il carico di fibre ottimale sui filtri è compreso tra 100 e 400 fibre/mm^2.

g) In ordine di preferenza l'intero filtro, o un suo segmento, posto su un vetrino da microscopio, è reso trasparente mediante il metodo acetone-triacetina e coperto con vetrino coprioggetti.

h) Per il conteggio è usato un microscopio binoculare con le seguenti caratteristiche:

Illuminazione Koehler.

Un condensatore ABBE o acromatico a contrasto di fase incorporato nel complesso posto sotto al piatto portaoggetti e montato con possibilità di centraggio e messa a fuoco. L'aggiustamento del centraggio per il contrasto di fase è indipendente dal meccanismo di centraggio del condensatore.

Un obiettivo acromatico a contrasto di fase positivo parafocale, a 40 ingrandimenti, con un'apertura numerica compresa tra 0,65 e 0,70 e con assorbimento dell'anello di fase compreso tra 65 e 85%.

Oculari a compensazione a 12,5 ingrandimenti. Almeno un oculare deve permettere l'inserimento di un reticolo ed essere del tipo con messa a fuoco.

Un reticolo oculare circolare Walton-Beckett che abbia un diametro apparente sul piano oggetto di 100 μm ± 2 μm quando si usano l'obiettivo e l'oculare indicati, e che sia controllato con un micrometro dell'oggetto.

i) Il microscopio è montato secondo le istruzioni del fabbricante e il limite di rivelabilità controllato mediante un "vetrino di prova per contrasto di fase". Quando siano usati nel modo specificato dal fabbricante si deve poter vedere fino al codice 5 sui vetrini di prova AIA e sino al blocco 5 sul vetrino di prova HSE/NPL Mark 2. Tale procedura deve essere effettuata all'inizio della giornata di lavoro.

l) Il conteggio dei campioni è effettuato secondo le seguenti regole:

Per fibra da contare si intende qualunque particella di lunghezza > 5 μm, diametro < 3 μm e rapporto lunghezza/diametro > 3:1 che non sia in contatto con una particella con diametro massimo maggiore di 3 μm.

Le fibre da contare che hanno le sue estremità entro l'area del reticolo devono essere contate come un'unica fibra; una fibra avente una sola estremità all'interno di tale area deve essere contata come mezza fibra.

Le aree del reticolo per il conteggio devono essere scelte a caso all'interno della superficie esposta al filtro.

Un agglomerato di fibre che appaia compatto e intero in uno o più punti della sua lunghezza, ma appaia diviso in trefoli (fibra ramificata) in altri, deve essere contato come fibra se è conforme al

primo trattino del presente punto; il diametro è misurato attraverso la parte intera e non quella ramificata.

In qualsiasi altro agglomerato di fibre in cui le singole fibre si tocchino o si incrocino (fascio), queste devono essere contate individualmente ogniqualvolta possano essere distinte sufficientemente per stabilire che sono conformi al primo trattino del presente punto. Se non è possibile distinguere nessuna singola fibra rispondente a tale definizione, il fascio deve essere contato come un'unica fibra, sempre che sia conforme nel suo complesso al primo trattino del presente punto.

Se più di un ottavo di un area del reticolo è coperto da un agglomerato di fibre e/o particelle, tale area del reticolo deve essere scartata ed un'altra area deve essere esaminata per il conteggio.

Si devono contare 100 fibre con un minimo di 20 aree di reticolo o esaminare 100 aree di reticolo.

m) Il numero medio di fibre per reticolo deve essere calcolato dividendo il numero delle fibre contate per il numero delle aree di reticolo esaminate. Il contributo al risultato finale del conteggio dovuto a segni del filtro o a contaminazione deve essere inferiore a 3 fibre per 100 aree di reticolo ed essere determinato con filtri "bianchi".

B) Microscopia elettronica a scansione (SEM)

1B) Procedura per campionamento e analisi:

a) Filtri di prelievo: membrana in policarbonato (NPF) da 0.8 μm di porosità, 25 mm di diametro (per il deposito usare la faccia più lucida).

(NOTA: Per ridurre la carica elettrostatica presente nelle membrane NPF, può essere utile ricoprirle preventivamente con uno strato di carbone, sotto vuoto, da ambedue le parti. Tale strato dovrebbe avere uno spessore non superiore a circa 100 nm).

b) Supporto cellulosico: membrane in esteri misti di cellulosa (o nitrato) da 3-8 μm di porosità, 25 mm di diametro.

c) Portafiltri: metallici con estensione metallica in materiale conduttivo o costruiti interamente in materiali conduttivi.

d) Flusso di prelievo: il flusso deve essere tale da assicurare una velocità lineare sulla faccia esposta della membrana pari a 0.35 m/sec ± 10%. La velocità lineare minima di 0.35 m/sec è necessaria per campionamenti che avvengono in presenza di elevata velocità dell'aria circostante il punto di prelievo (es. aria aperta o forti correnti d'aria).

Non è indispensabile in luoghi chiusi dove la velocità dell'aria è molto ridotta. In tal caso i parametri condizionanti sono il tempo di prelievo e l'intasamento del filtro, restando fisso il volume totale di ca. 30001.

Con filtri (o membrane) aventi diametro 25 mm e diametro effettivo di prelievo compreso tra 20 e 22 mm, il flusso di prelievo deve essere compreso tra 6 e 9 l/min ± 10% e mantenuto costante durante il tempo di prelievo. Il flusso di prelievo può essere superiore per ridurre i tempi di campionamento, compatibilmente con l'effetto di intasamento della membrana. Quando tale effetto

faccia abbassare il flusso al di sotto di circa 6 l/min, è opportuno interrompere il campionamento, annotando il volume di aria campionato (vedi il successivo punto).

e) Volume di aria da prelevare: il metodo prevede un volume minimo di campionamento pari a circa 3000 litri su di un'area effettiva di circa 315 mm^2 (diametro effettivo di ca. 20 mm).

Se la portata di prelievo è di circa 8 l/min, il tempo necessario sarà di circa 6 ore. Usando portate maggiori si può ridurre il tempo di campionamento (vedi punto *d*).

Se non è possibile prelevare 3000 litri su di una stessa membrana, a causa dell'eccessiva perdita di carico o dell'eccessivo deposito di particelle, si possono prelevare 2 campioni da circa 1500 litri ciascuno e quindi considerare i risultati analitici di questi sommandoli come se fossero riferiti ad un unico campione di ca. 3000 litri. Tale procedura può essere applicata anche a campioni prelevati con flussi di campionamento più elevati.

f) Preparazione dei campioni: si prepara una basetta sul portacampioni o stub (normalmente di alluminio) spalmando strati successivi di sospensione di grafite. Quando l'ultimo strato è ancora umido, si stende una porzione del filtro di prelievo (NPF), ritagliata con attenzione, evitando la caduta della polvere ivi depositata (per un portacampioni tipo Cambridge o Philips in Al è sufficiente ritagliare un quarto del filtro di prelievo). Durante la deposizione della porzione di filtro sulla grafite occorre evitare quanto più possibile la formazione di bolle d'aria. La preparazione si completa saldando, ove necessario, alcuni punti dei bordi della porzione di filtro con grafite, usando una punta sottile (ad esempio bastoncini di legno appuntiti). Successivamente a questa fase il campione sullo stub viene ricoperto con uno strato di oro di circa 25-50 nm, in uno "sputter coater". In caso di necessità di eseguire la microanalisi a dispersione di energia (EDXA) con maggiore accuratezza è opportuno eseguire il ricoprimento con carbone per uno strato di ca. 100 nm.

g) Condizioni strumentali: le condizioni di lavoro al SEM possono essere diverse per le differenti marche di microscopi, tuttavia esse devono essere tali da permettere la individuazione di fibre aventi almeno 0.2 micrometri di diametro.

I parametri che influenzano la visibilità o la microanalisi per l'identificazione delle fibre sono:

il voltaggio di accelerazione (VA): risulta soddisfacente un VA compreso tra 20 e 30 kV.

l'angolo di tilt: quando viene usato un angolo elevato è necessario operare una correzione per la determinazione della lunghezza delle fibre, inoltre, in questo caso si possono avere problemi di messa a fuoco.

Come raccomandazione generale occorre aggiustare l'angolo di tilt in modo da avere una buona resa microanalitica [$S \geq 3\sqrt{B}$, dove: S (segnale) = P (altezza del picco) - B (altezza del fondo)] e una buona visibilità per le fibre più sottili (intorno a 0.2 microns).

La distanza di lavoro: essa influenza sia la resa microanalitica, che la visibilità. In genere i SEM sono già ottimizzati rispetto a questo parametro.

Diametro del raggio elettronico: un diametro più elevato determina un conteggio di raggi X maggiore, una buona intensità del segnale, una risoluzione dell'immagine scarsa. Occorre scegliere le condizioni di compromesso più soddisfacenti.

L'allineamento del raggio, l'astigmatismo, la apertura, il contrasto e la luminosità dello schermo, devono essere impostate sperimentalmente per assicurare una adeguata visibilità.

Da notare che le dimensioni dello schermo, ovvero del campo di osservazione, possono essere diverse usando il modo "RASTER" oppure "TV".

h) Campi microscopici da esaminare: poiché la superficie corrispondente ad un campo di lettura (modo "TV") a 2000x circa, corrisponde a circa 2540 μm^2, per esplorare approssimativamente 1 mm^2 di superficie del filtro occorre osservare 400-450 campi. Nel caso in cui per raggiungere i 3000 litri siano stati prelevati 2 campioni da circa 1500 litri, su ciascun filtro si devono esplorare 400-450 campi e quindi si esprimeranno i risultati come indicato al punto 13.

i) Criteri di conteggio: vengono contate le fibre di lunghezza > 5 μm, diametro < 3 μm e rapporto lunghezza/diametro > 3:1.

Tutte le fibre che giacciono completamente entro l'area di conteggio (area del campo a 2000x corrispondente allo schermo posto nella posizione TV) vengono contate come una fibra.

Le fibre che sono a cavallo dei bordi dello schermo vengono contate come 1/2 fibra.

I campi di lettura devono essere scelti in modo da esplorare tutta la superficie del campione, evitando la sovrapposizione dei campi (è consigliabile stabilire un percorso sistematico a forma di "greca" operando sulle manopole degli assi x e y).

Un fascetto (fibra splittata) viene considerato come una fibra, se è conforme alle definizioni, il diametro deve essere misurato nella zona non separata di esso.

Le fibre in un agglomerato vengono contate singolarmente se vengono sufficientemente distinte (anche ad alto ingrandimento) purché soddisfino le dimensioni indicate nelle definizioni (in ogni caso si deve indicare il numero di agglomerati trovato).

Se più di 1/8 dell'area di conteggio (campo) è occupata da agglomerati di fibre o particelle, il campo viene respinto.

l) Filtri bianchi: almeno 2 membrane per ogni scatola di filtri, o il 10% dei campioni prelevati. Per filtro bianco si intende una membrana che abbia seguito tutte le varie fasi del campionamento (montata nel portafiltro, portata sul luogo di prelievo, aperta per il tempo necessario al prelievo, ma senza fare passare aria attraverso di essa) e quindi riportata, chiusa nel portafiltri, in laboratorio. I valori ottenuti dall'analisi dei bianchi non hanno influenza sul limite di rilevabilità del metodo, ma servono per il controllo della eventuale contaminazione delle membrane vergini.

m) Identificazione delle fibre: l'analisi elementare viene realizzata tramite lo spettrometro a raggi X a dispersione di energia (EDXS).

Le condizioni strumentali del SEM (distanza di lavoro, angolo di tilt, diametro del raggio elettronico, voltaggio di accelerazione, apertura dei condensatori, ampiezza del canale - generalmente è preferibile una ampiezza di 10 eV/canale, ma possono essere utilizzate ampiezze diverse comprese tra 10 e 50 eV/canale -, tempo di integrazione) devono essere aggiustate in modo tale da fornire uno spettro sufficientemente chiaro su una fibra di crisotilo standard di 0.2 μm di diametro.

Ciò significa che per i picchi del Mg e del Si devono essere contemporaneamente soddisfatte le relazioni:

$$S > 3\sqrt{B}, (S + B) / B > 2{\cdot}1$$

dove: S (segnale) + B (fondo) = altezza del picco (P).

In termini pratici è soddisfacente che i picchi di Mg e Si (crisotilo), Si e Fe (crocidolite e amosite), Mg, Si, Ca (tremolite), siano sufficientemente evidenziabili al di sopra del fondo in un tempo di integrazione compreso tra 30 e 100 secondi.

n) Variabilità del metodo: se si assume una distribuzione casuale di tipo Poissoniano delle fibre sulla membrana di prelievo, per un volume campionato di ca. 3000 litri (su un solo filtro o su due da 1500 litri ciascuno) e per una superficie del filtro esaminata pari a ca. 1 mm^2 il ritrovamento di 1 fibra corrisponde a ca. 100 F/m^3.

Assumendo valida una distribuzione Poissoniana, con il 95% di probabilità il numero medio di fibre per mm^2 sul filtro sarà compreso tra 0.025 F/mm^2 (limite fiduciario inferiore o LFI) e 5.6 F/mm^2 (limite fiduciario superiore o LFS) e cioè tra 2.5 e 560 F/m^3 (vedi tabelle della distribuzione di Poisson). Per 0 fibre trovate in ca. 1 mm^2, le tabelle indicano che il valore superiore della distribuzione Poissoniana è pari a ca. 4 $fibre/mm^2$ e cioè una concentrazione pari a ca. 400 F/m^3.

o) Espressione dei risultati:

$$C = (n \cdot \pi \cdot d^2)/(4 \cdot N \cdot A \cdot V)$$

C =Fibre/m^3;
n =n. di fibre conteggiate su un solo filtro da 3000 litri, oppure su due filtri da circa 1500 litri ciascuno. Nel caso che sia disponibile un solo filtro (con meno di 3000 litri) ci si riferirà solo a questo, tenendo conto che il LAA sarà diverso;
N =n. di campi esaminati su ogni filtro;
d =diametro effettivo del filtro di prelievo in metri;
A =area di un campo a 2000x circa, in m^2;
V =volume prelevato in m^3.

---

(4) Recepita con *D.Lgs. 15 agosto 1991, n. 277*, pubblicato nella Gazz. Uff. 27 agosto 1991, n. 200, S.O. n. 53.

(5) Recepita con *D.Lgs. 15 agosto 1991, n. 277*, pubblicato nella Gazz. Uff. 27 agosto 1991, n. 200, S.O. n. 53.

(6) Recepita con *D.Lgs. 15 agosto 1991, n. 277*, pubblicato nella Gazz. Uff. 27 agosto 1991, n. 200, S.O. n. 53.