



In questo numero:

Analisi multiresiduale LC-MS mediante arricchimento in linea del campione (on-line SPE/UHPLC-ESI-MS/MS) per la determinazione di acidi perfluoroalchil-carbossilati e perfluoroalchilsolfonati nelle acque dolci naturali

News:

Criticità connesse all'applicazione della nuova Direttiva 2013/39/UE sulle sostanze prioritarie negli ambienti acquatici

In breve:

Tesi di Dottorato: Studio di processi abiotici che influenzano la speciazione e circolazione del selenio in sistemi acquatici.

Tesi di Laurea Magistrale: Biodegradazione di una miscela binaria di composti xenobiotici, in un reattore SBR operante in modalità TPPB con fase di partizione costituita da un polimero commerciale e da un polimero di scarto

Progetto di Ricerca: Novel processing routes for effective sewage sludge management

La disinfezione delle acque reflue e l'impatto sulla comunità microbica

Automazione ed analisi ambientale

25° Corso Internazionale di Specializzazione "Controllo e gestione del processo a fanghi attivi tramite metodi microbiologici"

2

13

23

25

27

30

32

34

Editoriale

Il Notiziario dei Metodi Analitici è stato pubblicato per la prima volta nel 1995, come diretta emanazione del più vecchio notiziario "Metodi analitici per le acque" (il primo numero risale al gennaio del 1981), nato con lo scopo di fornire un contributo alla divulgazione e al trasferimento dei risultati di studi riguardanti l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi degli inquinanti nelle acque.

Nei settantasei numeri complessivi fin qui pubblicati hanno trovato spazio articoli relativi a lavori originali, review, informazioni e proposte di nuovi protocolli. Sono stati inoltre pubblicati numeri monografici dedicati alle attività di implementazione della direttiva quadro 2000/60/CE (WFD), che sono richiamati esplicitamente nella normativa nazionale inerente il monitoraggio dei corpi idrici superficiali (D. M. 56/2009 e D. M. 260/2010).

In questo numero Il Notiziario IRSA si presenta in una veste rinnovata con l'obiettivo di ampliare i contenuti tematici della rivista affiancando alla storica sezione dedicata all'Analitica una sezione News che raccoglie contributi di varia natura. In particolare, nella prima verranno ospitati metodi analitici sviluppati per diverse matrici ambientali (acque, fanghi, sedimenti, suolo) specificandone il grado di maturazione, validità e applicabilità a livello normativo (Metodo/Proposta di metodo/Metodo interno/Nota tecnica). Nella seconda troveranno spazio contributi riguardanti soluzioni tecnologiche innovative applicate ai trattamenti depurativi di acque e fanghi e al biorisanamento, riflessioni e commenti su nuovi provvedimenti legislativi approvati o su ipotesi di modifica di normative vigenti a livello nazionale o comunitario, segnalazioni di lavori di particolare interesse usciti su riviste internazionali, review, descrizioni di attività di ricerca in corso anche attraverso la pubblicazione di una sintesi delle tesi di laurea e/o di dottorato svolte all'interno dell'Istituto.

Confidando che le modifiche apportate possano incontrare il favore degli addetti ai lavori, si rinnova l'invito alla comunità scientifica e agli operatori del settore a collaborare con la rivista sottoponendo al Comitato di Redazione articoli, note ed altro materiale meritevole di pubblicazione.

In ultimo, abbiamo il piacere di segnalare l'allestimento di un'edizione speciale, in occasione del 25° anniversario, del corso internazionale di specializzazione "Operation and control of activated sludge processes using microbiological analysis". Il corso, organizzato dall'IRSA in collaborazione con l'IWA e la Scuola Umbra di Amministrazione Pubblica (Villa Umbra, loc. Pila, PG, 16- 20 giugno 2014), si propone di fare il punto sulle conoscenze oggi disponibili sui fondamentali aspetti del processo a fanghi attivi, oltre a delinearne gli scenari futuri.

Roma, dicembre 2013

Il Direttore
Dr. Maurizio Pettine

Analisi multiresiduale LC-MS mediante arricchimento in linea del campione (on-line SPE/UHPLC-ESI-MS/MS) per la determinazione di acidi perfluoroalchilcarbossilati e perfluoroalchilsolfonati nelle acque dolci naturali

a cura di Valsecchi S.*, Mazzoni M. e Polesello S.

Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR, Brugherio (MB)

RIASSUNTO

Viene descritto un metodo UHPLC-MS, accoppiato alla preconcentrazione in linea del campione, per la misura simultanea di nove composti perfluoroalchilcarbossilici da 4 a 12 atomi di carbonio e tre composti perfluoroalchilsolfonici con 4, 6 e 8 atomi di carbonio in campioni acquosi.

Il metodo, che prevede l'iniezione di 5 mL di campione e la quantificazione mediante diluizione isotopica con riferimenti marcati con isotopi stabili, è stato validato. La linearità, in un intervallo di due ordini di grandezza (tra LOQ e 100 ng/L per PFUnDA e PFDoDA e tra LOQ e 200 ng/L per gli altri composti), è risultata buona e i recuperi degli analiti in matrici reali (acqua di rubinetto e acque di fiume a diverso grado di contaminazione) sono risultati soddisfacenti e compresi tra il 76% e il 134%. I limiti di determinazione e di quantificazione, che comprendono anche le perdite durante l'estrazione, sono compresi tra 0,2 a 5,0 ng/L e tra 1 a 20 ng/L, rispettivamente.

L'accoppiamento della fase di estrazione del campione e di analisi cromatografica permette di limitare il volume di campione da raccogliere, ridurre le fasi di manipolazione (eventuale centrifugazione e acidificazione del campione prima dell'iniezione) ed ottenere, quindi, un metodo ad alta produttività analitica da implementare in programmi di monitoraggio ambientale.

SUMMARY

An UHPLC-ESI-MS/MS multi-residue method based on an on-line SPE procedure for the simultaneous determination of nine perfluoroalkyl carboxylates (from 4 to 12 carbon atoms) and three perfluoroalkyl sulphonates (4, 6 and 8 carbon atoms) is described. The results of the in house validation, for 5 mL injection, showed good linearity ranges spanning two orders of magnitude between LOQ and 100 ng/L for PFUnDA and PFDoDA and LOQ and 200 ng/L for the other compounds. The percentage of recoveries, between 76 and 134%, calculated in different matrices (tap water and rivers impacted by different pollutions) were generally satisfactory. LODs and LOQs of this on-line SPE method, which also incorporate recovery losses, ranged from 0,2 to 5,0 ng/L and from 1 to 20 ng/L respectively.

The linking of the sample extraction and the chromatographic analysis allows to limit the volume of sample to be collected, to reduce handling steps (centrifugation and the acidification of the sample before injection) and obtain a high-throughput analytical method to be implemented in environmental monitoring programs.

INTRODUZIONE

Le sostanze alchiliche perfluorurate (PFAS) sono composti costituiti da una catena alchilica idrofobica parzialmente o interamente fluorurata di varia lunghezza (in genere da C₄ a C₁₄) e un gruppo idrofilico. Queste sostanze sono utilizzate da tempo in una vasta gamma di prodotti industriali e di consumo (Prevedouros et al., 2006; Buck et al., 2011) e a causa della loro persistenza e dell'elevata stabilità chimica sono ormai diffuse in tutte le parti del globo (Giesy et al., 2001 e 2002; Kannan, 2011; Lindstrom et al., 2011).

I PFAS comprendono migliaia di sostanze chimiche, ma gli studi ambientali si sono concentrati principalmente sugli acidi perfluoroalchilsolfonici (PFSA), come ad esempio l'acido perfluorooottansolfonico (PFOS), perfluoroalchilsolfonammidi e gli acidi perfluoroalchilcarbossilici (PFCA), che comprendono l'acido perfluorooottanoico (PFOA).

I PFSA e PFCA sono tensioattivi a basso peso molecolare, costituiti da serie omologhe di molecole che dif-

feriscono nella lunghezza della catena alchilica, in cui tutti gli atomi di carbonio della catena sono legati ad atomi di fluoro. È stato dimostrato che PFOS e PFOA sono persistenti nell'ambiente e bioaccumulabili nella catena trofica (Lindstrom et al., 2011). Dopo uno studio di valutazione del rischio, la Commissione europea ha recentemente proposto di inserire il PFOS nell'elenco delle sostanze pericolose prioritarie che devono essere monitorate nei corpi idrici dell'Unione europea, stabilendo uno standard di qualità ambientale (EQS) di 0,65 ng/L per le acque dolci (Direttiva 2013/39/UE), mentre l'agenzia per la protezione dell'ambiente americana (EPA) ha proposto dei valori guida provvisori per le acque potabili pari a 400 ng/L e 200 ng/L per PFOA e PFOS rispettivamente (USEPA, 2009). L'introduzione di restrizioni normative per l'uso di PFOS e PFOA (Direttiva 2006/122/CE; USEPA, 2006) ha indotto i maggiori produttori di PFAS a trovare dei sostituti per questi composti soprattutto fra gli omologhi con una più corta catena alchilica. Da qui la necessità di metodi multiresiduali, che possano essere impiegati nel monitoraggio di routine, per la determinazione di un gran numero di composti

* valsecchi@irsa.cnr.it

perfluoroalchilcarbossilici e perfluoroalchilsolfonici.

In questo articolo viene presentato un metodo LC-MS, accoppiato alla preconcentrazione in linea del campione, per la determinazione simultanea in campioni acquosi di acidi perfluoroalchilcarbossilici da 4 a 12 atomi di carbonio e acidi perfluoroalchilsolfonici con 4, 6 e 8 atomi di carbonio (Tab. 1). L'accoppiamento della fase di estrazione del campione e di analisi cro-

matografica permette di limitare il volume di campione da raccogliere in fase di campionamento, ridurre le fasi di manipolazione del campione ed ottenere, quindi, un metodo ad alta produttività analitica, adatto ad essere implementato in programmi di monitoraggio ambientale.

Tab. 1 - Elenco degli acidi perfluoroalchilcarbossilici e perfluoroalchilsolfonici analizzabili con il presente metodo

Composto	Sigla	Formula	N° Atomi Carbonio	Peso molecolare	N° CAS
Acido perfluorobutanoico	PFBA	C ₄ HF ₇ O ₂	4	214	375-22-4
Acido perfluoropentanoico	PFPeA	C ₅ HF ₉ O ₂	5	264	2706-90-3
Acido perfluoroesanoico	PFHxA	C ₆ HF ₁₁ O ₂	6	314	307-24-4
Acido perfluoroeptanoico	PFHpA	C ₇ HF ₁₃ O ₂	7	364	375-85-9
Acido perfluoroottanoico	PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂	8	414	335-67-1
Acido perfluorononaico	PFNA	C ₉ HF ₁₇ O ₂	9	464	375-91-1
Acido perfluorodecanoico	PFDA	C ₁₀ HF ₁₉ O ₂	10	514	335-76-2
Acido perfluoroundecanoico	PFUnDA	C ₁₁ HF ₂₁ O ₂	11	564	2058-94-8
Acido perfluorododecanoico	PFD _o DA	C ₁₂ HF ₂₃ O ₂	12	614	307-55-1
Acido perfluorobutansolfonico	PFBS	C ₄ HF ₉ O ₃ S	4	300	375-73-5
Acido perfluoroesansolfonico	PFHxS	C ₆ HF ₁₃ O ₃ S	6	400	355-46-4
Acido perfluoroottansolfonico	PFOS	C ₈ HF ₁₇ O ₃ S	8	500	1763-23-1

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consente di determinare la concentrazione di nove acidi perfluoroalchilcarbossilici (da 4 a 12 atomi di carbonio) e tre perfluoroalchilsolfonici (4, 6 e 8 atomi di carbonio) in campioni acquosi centrifugati ed acidificati. L'estrazione del campione e la preconcentrazione degli analiti vengono effettuate in simultanea mediante l'utilizzo di un sistema di preconcentrazione in linea che impiega una colonna di arricchimento a fase polare (on-line SPE). In seguito gli analiti, concentrati in testa alla colonna di preconcentrazione, vengono eluiti in controcorrente dal gradiente analitico ad alta pressione (UHPLC) e separati su fase pentafluorofenilica prima della rivelazione mediante spettrometro di massa a triplo quadrupolo. La ionizzazione è ottenuta mediante elettronebulizzazione negativa e lo spettrometro di massa opera in modalità *Multiple Reaction Monitoring* ((-)ESI-MS/MS).

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile ad acque dolci naturali: superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche. Considerando il volume di campione preconcentrato (5 mL), il limite di rilevabilità è compreso tra 0,2 e 5 ng/L.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Gli acidi perfluoroalchilcarbossilici sono utilizzati durante la produzione dei polimeri fluorurati e quindi possono essere rilasciati dalle parti in fluoropolimero (es. sistema di degasaggio in linea, guarnizioni, ecc.) della strumentazione cromatografica. Inoltre composti perfluorurati possono essere contenuti nei solventi e nei tamponi impiegati come eluenti. La sostituzione delle parti fluorurate del sistema cromatografico può aiutare a ridurre, ma non ad eliminare completamente, la contaminazione dovuta al rilascio del sistema strumentale. Il problema può essere evitato inserendo, prima dell'iniettore, una colonna a fase inversa (*trap column*, come indicato nel paragrafo *Apparecchiature*) per intercettare e ritardare eventuali analiti provenienti dai solventi della fase mobile e/o dalla strumentazione cromatografica.

Meno frequente, ma potenzialmente più problematica, è la contaminazione dei bianchi di estrazione. È buona norma evitare l'impiego di materiali fluoropolimerici in laboratorio durante la conservazione e la preparazione del campione e risciacquare rigorosamente con metanolo, prima dell'uso, tutta l'attrezzatura che entra in contatto con il campione.

La coeluzione di costituenti della matrice può essere causa di effetti di potenziamento o di soppressione della ionizzazione degli analiti. Per mitigare

gli effetti della matrice durante l'analisi strumentale e la quantificazione può essere utilizzata la diluizione isotopica con riferimenti interni marcati isotopicamente.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni vengono prelevati in bottiglie di polipropilene o polietilene, conservati al buio ad una temperatura di 4°C. I campioni sono stabili fino a 5 giorni in queste condizioni.

Prima dell'analisi i campioni sono acidificati con acido formico (50 µL di acido formico 99% per 10 mL di campione). Per campioni con particolato (es. acque superficiali), per impedire l'occlusione delle parti dell'iniettore o della colonna di preconcentrazione, prima dell'acidificazione si consiglia la centrifugazione a 9000 giri/minuto, a 10°C per 10 minuti.

5 - APPARECCHIATURE

- 5.1 *on-line SPE/UHPLC* Sistema cromatografico costituito da un autocampionatore, un *loop* da 5 mL, da una pompa HPLC, una pompa UHPLC e da 2 valvole a 6 vie per la preconcentrazione in linea del campione.
- 5.2 *Colonna a fase C₁₈ (trap column) da inserire tra la pompa UHPLC e la valvola d'iniezione*
- 5.3 *Colonna per preconcentrazione a fase polare*
- 5.4 *Colonna per separazione cromatografica a fase pentafluorofenilica*
- 5.5 *Spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sorgente di elettronebulizzazione operante in modalità negativa, (-)ESI (Electrospray Ionisation), e in Multiple Reaction Monitoring (MRM).*

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado LC-MS e l'acqua utilizzata deve essere ad elevato grado di purezza (<18 MWcm) (Millipore, Bedford, MA, USA). Tutte le soluzioni di riferimento sono state conservate al buio a 4°C.

- 6.1 *Acido perfluorobutanoico (PFBA), acido perfluoropentanoico (PFPeA), acido perfluoroesanoico (PFHxA), acido perfluoroeptanoico (PFHpA), acido perfluoroottanoico (PFOA), acido perfluorononanoico (PFNA), acido perfluorodecanoico (PFDA), acido perfluoroundecanoico (PFUnDA), acido perfluorododecanoico (PFDoDA), perfluorobutansolfonato di tetrabutilammonio (PFBS), perfluoroesansolfonato di potassio (PFHxS) e perfluorottansolfonato di tetrabutilammonio (PFOS)*
- 6.2 *Soluzioni di riferimento concentrate dei singoli analiti in metanolo (1 mg/mL)*
- 6.3 *Soluzioni di riferimento concentrata multicomponente (10 µg/mL)*
Preparare una soluzione multicomponente con-

centrata con tutti i 12 analiti diluendo in metanolo le soluzioni concentrate (6.2).

6.4 *Soluzioni di riferimento diluite (1-200 ng/L)*

Preparare, periodicamente, soluzioni di riferimento diluite contenenti tutti gli analiti diluendo, opportunamente, la soluzione (6.3) in acqua potabile non contaminata.

6.5 *Soluzione di riferimento contenente PFCA and PFSA marcati con isotopi stabili*

6.6 *Soluzioni di riferimento diluita contenente riferimenti interni (40 ng/mL)*

Diluire opportunamente la soluzione (6.5) con metanolo. Aggiungere 25 µL di questa soluzione a 10 mL di campione per ottenere una concentrazione finale di riferimento interno marcato di 100 ng/L.

7 - ANALISI

In Fig. 1 sono riportate le fasi della preconcentrazione mediante il sistema on-line SPE. Nella prima fase (1) il campione da analizzare viene trasferito in automatico, mediante la siringa dell'autocampionatore, nel *loop* che determina il volume preconcentrato; la colonna di preconcentrazione e la colonna analitica sono condizionate con i rispettivi eluenti. Nella seconda fase (2) la prima valvola a 6 vie commuta e l'eluente, che prima andava direttamente nella colonna di preconcentrazione, passa attraverso il *loop* e carica il campione nella colonna di preconcentrazione; gli analiti si concentrano in testa alla colonna mentre la matrice acquosa viene persa nello scarico. Nella terza fase (3) la seconda valvola a 6 vie viene commutata e l'eluente che prima andava direttamente nella colonna analitica passa in contro-flusso nella colonna di preconcentrazione eluendo gli analiti che in essa si erano concentrati. Nella quarta fase (4) la separazione cromatografica avviene nella colonna analitica mentre la colonna di preconcentrazione è ricondizionata per l'analisi successiva.

Al termine della separazione cromatografica gli analiti vengono rivelati mediante spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sorgente di elettronebulizzazione, ESI (*Electrospray Ionisation*), operante in modalità negativa e MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

8 - CALCOLI

L'analisi quantitativa può essere effettuata mediante taratura esterna con soluzioni di riferimento preparate in matrice per quei campioni in cui sono assenti o limitati gli effetti sulla ionizzazione, ad esempio l'acqua potabile. Quando, invece, si sospetta soppressione o potenziamento della ionizzazione per effetto della matrice che coeluisce con il composto da analizzare si consiglia, per la quantificazione, il metodo della diluizione isotopica con riferimenti marcati con isotopi stabili. La soppressione o il potenziamento della ionizzazione dipendono dal composto da ionizzare e dai costituenti della matrice che coeluiscono con il composto stesso; per questo motivo la risposta del

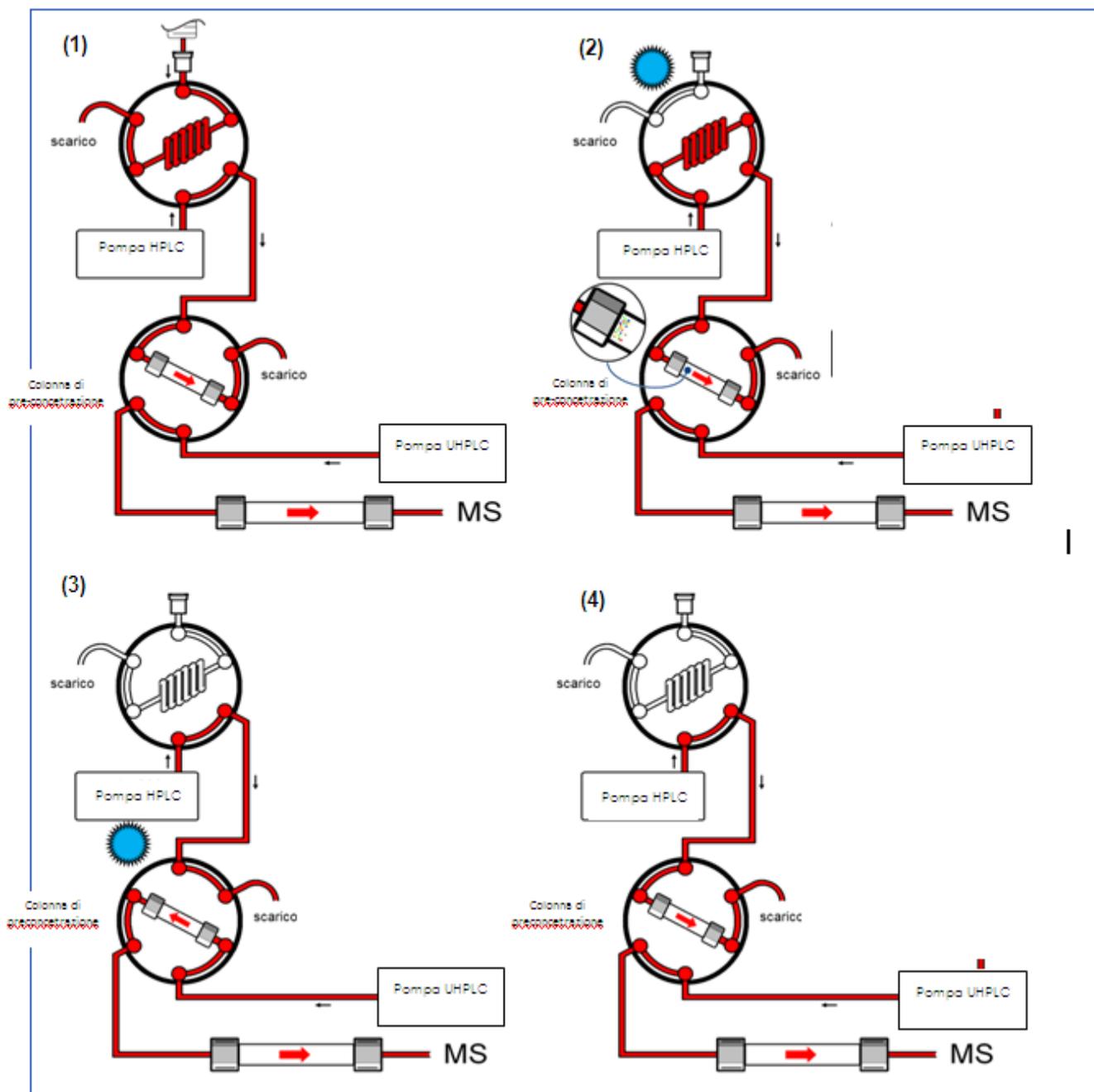


Fig. 1 - Schema delle fasi di preconcentrazione: (1) fase di riempimento del loop; (2) fase di preconcentrazione del campione; (3) fase di trasferimento alla colonna analitica; (4) fase di separazione cromatografica e contemporaneo lavaggio e ricondizionamento della colonna di preconcentrazione

Tab. 2 - Condizioni operative della fase di preconcentrazione

Pompa di preconcentrazione	Thermo ACCELA 600 pump
Colonna di arricchimento	20x2,1 mm (12 µm) Thermo Hipersyl GOLD aQ
Fase mobile	(A) 2 mM CH ₃ CO ₂ NH ₄ + 5% MeOH; (B) MeOH
Flusso	come in Tab. 4
Temperatura	ambiente
Gradiente	come in Tab. 4
“Loop”	5 mL

riferimento marcato di un analita non può essere utilizzata per correggere la risposta di un altro analita.

9 - VALIDAZIONE DEL METODO

Per la validazione tutti i reattivi (6.1) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La soluzione di riferimento (6.5) con riferimenti marcati con isotopi stabili ("Stable Isotopic Labelled-Internal Standard", SIL-IS) contenente $^{13}\text{C}_4$ -PFBA, $^{13}\text{C}_2$ -PFHxA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_5$ -PFNA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, $^{13}\text{C}_2$ -PFUnDA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDoDA, $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS e $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, è stata acquistata da Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada).

Il sistema on-line SPE/UHPLC-ESI-MS/MS utilizzato era costituito da un autocampionatore EQUAN (Thermo Fisher Scientific) per la preconcentrazione in linea del campione, dotato di una pompa di preconcentrazione HPLC ACCELA 600 pump (Thermo Fisher Scientific) e 3 valvole VICI Cheminert a 6 vie (2 per la preconcentrazione e una per l'iniezione diretta da *loop*) e da una pompa analitica UHPLC ACCELA 1250 pump (Thermo Fisher Scientific). Per l'estrazione del campione e la preconcentrazione degli acidi perfluorurati è stata impiegata una colonna C18 *polar end-capped* (Thermo Hypersyl Gold aQ) applicando le condizioni riportate in Tab. 2. Tra la pompa UHPLC e la valvola d'iniezione è stata inserita una colonna a fase inversa (*trap column*, Tab. 3) per intercettare e ritardare eventuali analiti provenienti dai solventi della fase mobile e/o dal rilascio delle parti in fluoropolimero della strumentazione cromatografica. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna con fase stazionaria *pentafluorofenilica* (Thermo Hypersyl GOLD PFP) e le condizioni analitiche riportate in Tab. 3. I gradienti cromatografici della pompa analitica e di pre-concentrazione utilizzati sono riportati in Tab. 4.

Per quanto concerne lo spettrometro di massa, in Tab. 5 sono elencate le condizioni di lavoro della sorgente mentre i parametri LC/MS/MS specifici per ogni analita e per i riferimenti marcati sono indicati in Tab. 6.

In Figg. 2-3 sono riportati i cromatogrammi di una soluzione di riferimento di acidi perfluoroalchilsolfonici e perfluoroalchilcarbossilici avente una concentrazione di 100 ng/L. In particolare, sono riportati i cromatogrammi relativi alle transizioni degli analiti e dei riferimenti marcati (SIL-IS) monitorati in modalità MRM. Nel caso di PFHxS e PFOS si può notare la presenza di due picchi cromatografici in quanto la colonna analitica è in grado di separare, seppure non completamente, la miscela degli isomeri ramificati (primo picco) dall'isomero lineare (secondo picco) che è presente in maggior quantità nella miscela commerciale con cui è stata preparata la soluzione di riferimento. Tale fenomeno si riscontra anche nell'analisi di campioni reali (Fig. 4b, sinistra). Inoltre, nel caso di campioni ambientali molto contaminati, anche per gli altri analiti è possibile rilevare due picchi costituiti dalla miscela dei ramificati e dall'isomero lineare (Fig. 4b, destra).

9.1 - Intervallo di linearità e sensibilità

La linearità del metodo con diluizione isotopica è stata valutata iniettando soluzioni di riferimento a cinque livelli di concentrazione (da LOQ a 100 ng/L per PFUnDA e PFDoDA e tra LOQ e 200 ng/L per gli altri composti) fortificate con SIL-IS a 100 ng/L. La linearità è risultata buona con coefficienti di determinazione (R^2) superiori a 0,95 per tutti gli analiti (Tab. 7).

I limiti di determinazione (LOD) e i limiti di quantificazione (LOQ) sono stati stimati a tre e dieci volte, rispettivamente, lo scarto tipo della risposta strumentale di un campione di acqua potabile non contaminata fortificata con aggiunte degli analiti a concentrazioni comprese tra 1 e 20 ng/L. LOD e LOQ sono compresi tra 0,2 ng/L e 5,0 ng/L e tra 1 ng/L e 20 ng/L, rispettivamente (Tab. 7). È importante sottolineare che questi valori si riferiscono all'intera procedura analitica, che incorpora anche le eventuali perdite durante l'estrazione e la preconcentrazione, quindi più aderenti alla situazione reale rispetto ai valori ottenuti utilizzando soluzioni di riferimento in solvente organico.

9.2 - Precisione e accuratezza

La precisione del metodo è stata valutata mediante 3 iniezioni ripetute di acqua potabile fortificata (tra 20 e 200 ng/L per PFBA, PFBS, PFHxS e PFOS e tra 2 e 200 ng/L per gli altri composti) replicate in 4 giorni non consecutivi (Tab. 7). Ripetibilità (precisione *intra-day*) e riproducibilità (precisione *inter-day*) sono risultate meno del 20% per gli omologhi degli acidi carbossilici tra 7 e 9 atomi di carbonio, mentre PFBS, PFHxS, PFOS, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFDA, PFUnDA e PFDoDA mostrano riproducibilità comprese tra 25% e 65% al limite inferiore del campo esplorato, che è molto vicino al limite di determinazione. Non essendo disponibili per i PFAS materiali di riferimento certificati in matrici acquose, l'accuratezza, espressa come recupero percentuale, è stata ricavata analizzando campioni reali di acqua potabile e di fiume, contaminati artificialmente con aggiunte note di analiti (100 ng/L). I recuperi risultano soddisfacenti e compresi tra 76% e 134% per gli acidi perfluoroalchilcarbossilici e tra 87% e 115% per i composti perfluoroalchilsolfonici.

Tab. 3 - Separazione su colonna analitica

Pompa analitica	Thermo ACCELA 1250 pump
Colonna di separazione	50x2,1 (1,9 µm) Thermo Hypersyl GOLD PFP
“Trap column”	50x2,1 mm (1,9 µm) Thermo GOLD Hypersil (tra la pompa analitica e la valvola di iniezione)
Fase mobile	(A) 2 mM CH ₃ CO ₂ NH ₄ + 5% MeOH; (B) MeOH
Flusso	300 µL/min
Temperatura	ambiente
Gradiente	come in Tab. 4

Tab. 4 - Gradiente analitico e di preconcentrazione

Minuti	Pompa analitica		Pompa di preconcentrazione		
	A%	B%	flusso (µL/min)	A%	B%
0	95	5	1200	100	0
3.00	95	5			
4.50			1200	100	0
5.00	30	70			
6.50			200	10	90
10.00	0	100			
11.50			200	10	90
13.50	0	100			
14.50	95	5	1200	100	0
15.50	95	5	1200	100	0

Tab. 5 - Condizioni operative dello spettrometro di massa

Spettrometro di massa	Thermo Quantum Access Max
Sorgente di ionizzazione	HESI, Heated Electrospray Ionisation “Spray Voltage” 3500 V “Capillary Temperature” 270 °C “Sheath Gas” 25 au “Auxiliary Gas” 10 au “Vaporizer Temperature” 40 °C
Condizioni di ionizzazione	ionizzazione negativa
Modalità di acquisizione degli ioni	Multiple Reaction Monitoring (MRM), come in Tab. 6
Gas di collisione	argon
Pressione del gas di collisione	1,5 (mTorr)

Tab. 6 - Parametri LC/MS/MS per tutti gli analiti e i riferimenti marcati (SIL-IS) utilizzati nella validazione del metodo

Sigla	Composto	Precursore (ione molecolare) [M-H] ⁻	Frammenti		
			(m/z)	Energia di collisione	"Tube Lens Offset"
PFBA	Acido perfluorobutanoico	212,9	168,9	11	80
PFPeA	Acido perfluoropentanoico	262,9	69,0	39	85
PFHxA	Acido perfluoroesanoico	312,9	119,1	22	86
			268,9	11	86
PFHpA	Acido perfluoroeptanoico	362,9	169,0	18	91
			318,9	12	91
PFOA	Acido perfluorooctanoico	412,9	169,0	19	96
			368,9	13	96
PFNA	Acido perfluorononanoico	462,9	218,9	18	104
			418,9	13	104
PFDA	Acido perfluorodecanoico	512,9	268,9	18	97
			468,9	13	97
PFUnDA	Acido perfluoroundecanoico	562,9	268,8	20	96
			518,8	14	96
PFDoDA	Acido perfluorododecanoico	612,9	318,8	20	107
			568,9	14	107
PFBS	Acido perfluorobutansolfonico	298,9	80,2	44	85
			99,1	32	85
PFHxS	Acido perfluoroesansolfonico	398,9	80,1	38	91
			99,0	34	91
PFOS	Acido perfluorooctansolfonico	498,9	80,3	45	104
			99,1	45	104
Riferimento interno					
¹³ C ₄ -PFBA	Acido perfluoro-n-[¹³ C ₄] butanoico	216,9	171,9	11	80
¹³ C ₂ -PFHxA	Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] esanoico	314,9	269,9	11	86
¹³ C ₄ -PFOA	Acido perfluoro-n-[¹³ C ₄] octanoico	416,9	371,9	13	96
¹³ C ₅ -PFNA	Acido perfluoro-n-[¹³ C ₅] nonanoico	467,9	422,9	13	104
¹³ C ₂ -PFDA	Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] decanoico	514,9	469,9	13	97
¹³ C ₂ -PFUnDA	Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] undecanoico	564,9	519,8	14	96
¹³ C ₂ -PFDoDA	Acido perfluoro-n-[¹³ C ₂] dodecanoico	614,9	569,9	14	107
¹⁸ O ₂ -PFHxS	Acido perfluoro-n-esan [¹⁸ O ₂] solfonico	402,9	103,0	34	91
¹³ C ₄ -PFOS	Acido perfluoro-n-ottan [¹³ C ₄] solfonico	502,9	99,1	45	104

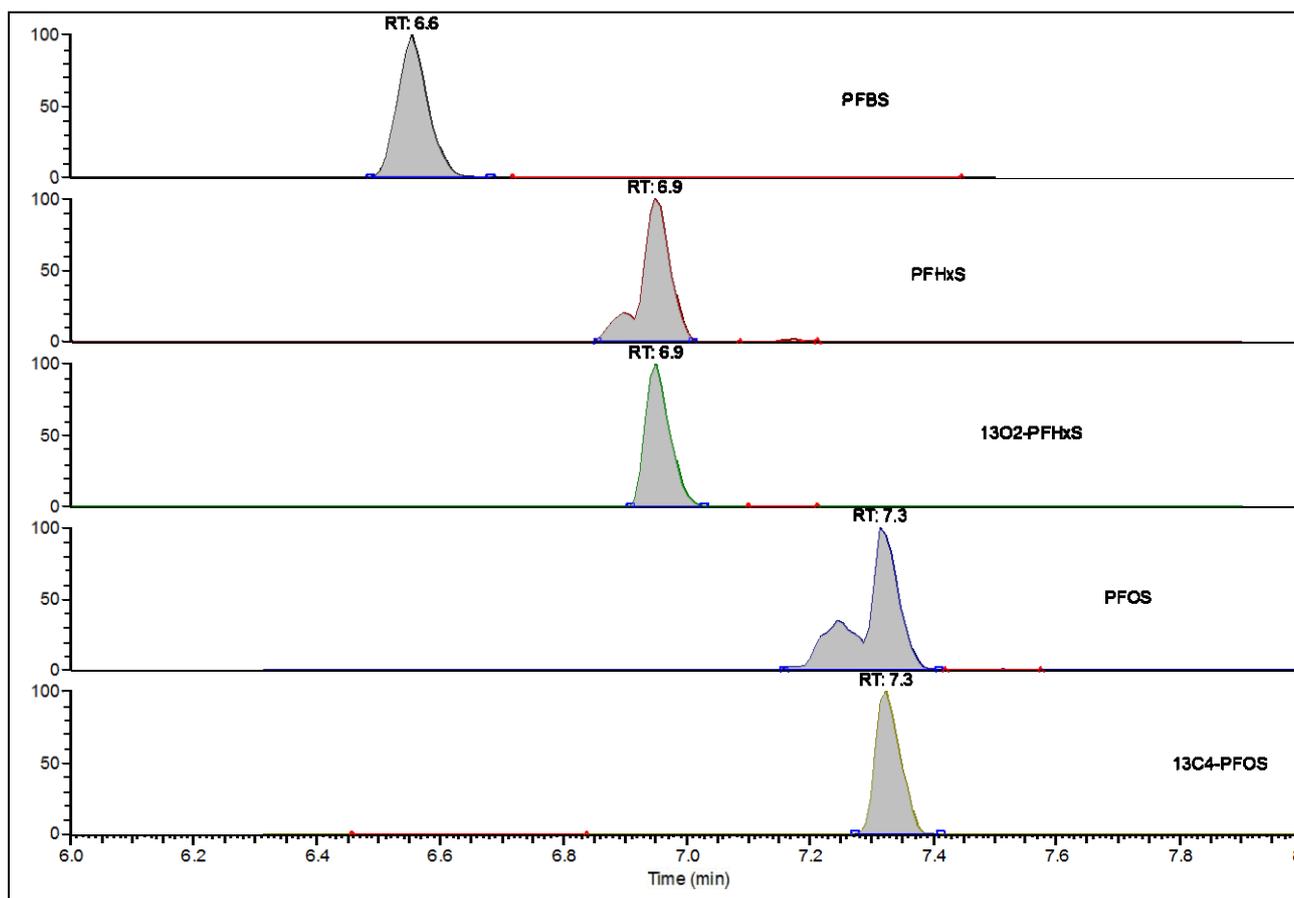
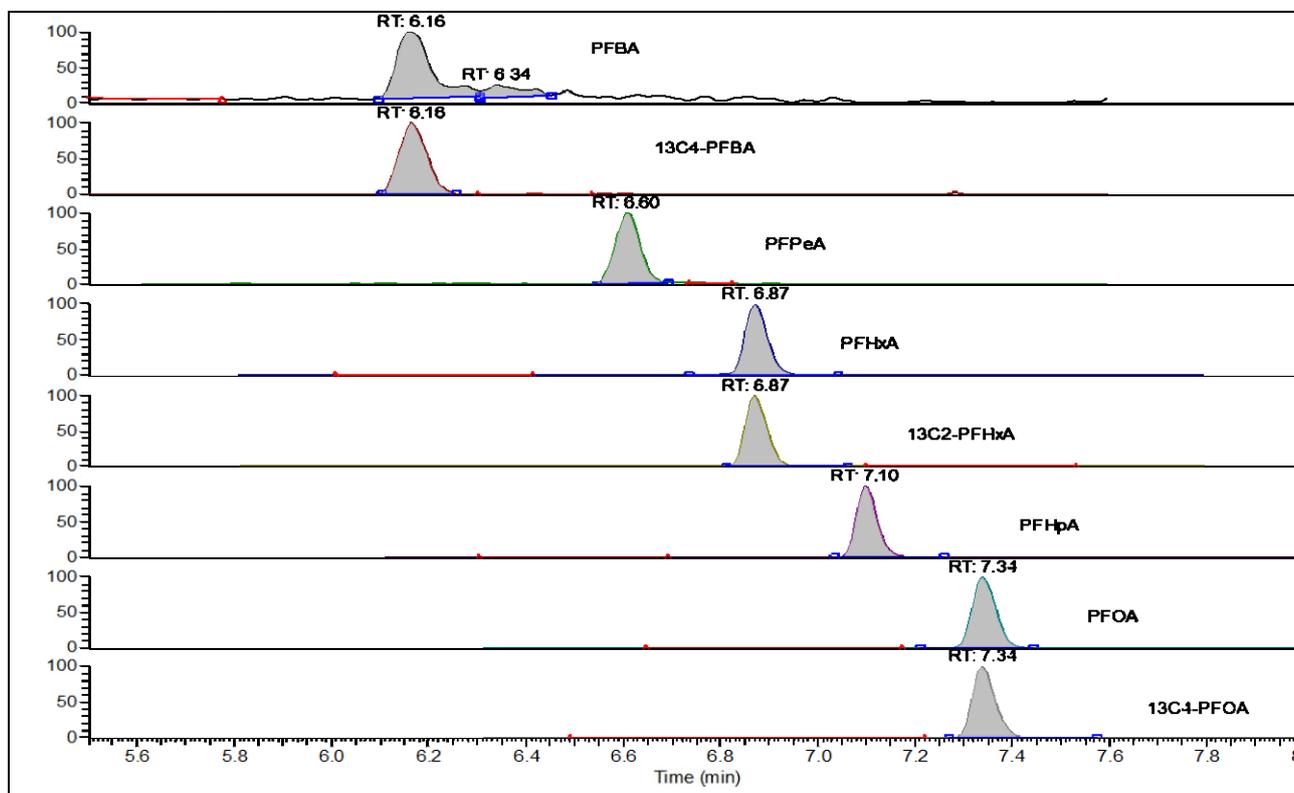


Fig. 2 - Analisi di una soluzione di riferimento di acidi perfluoroalchilsolfonici(100 ng/L). I cromatogrammi si riferiscono alle transizioni degli analiti e dei riferimenti marcati (SIL-IS) monitorati in modalità MRM.



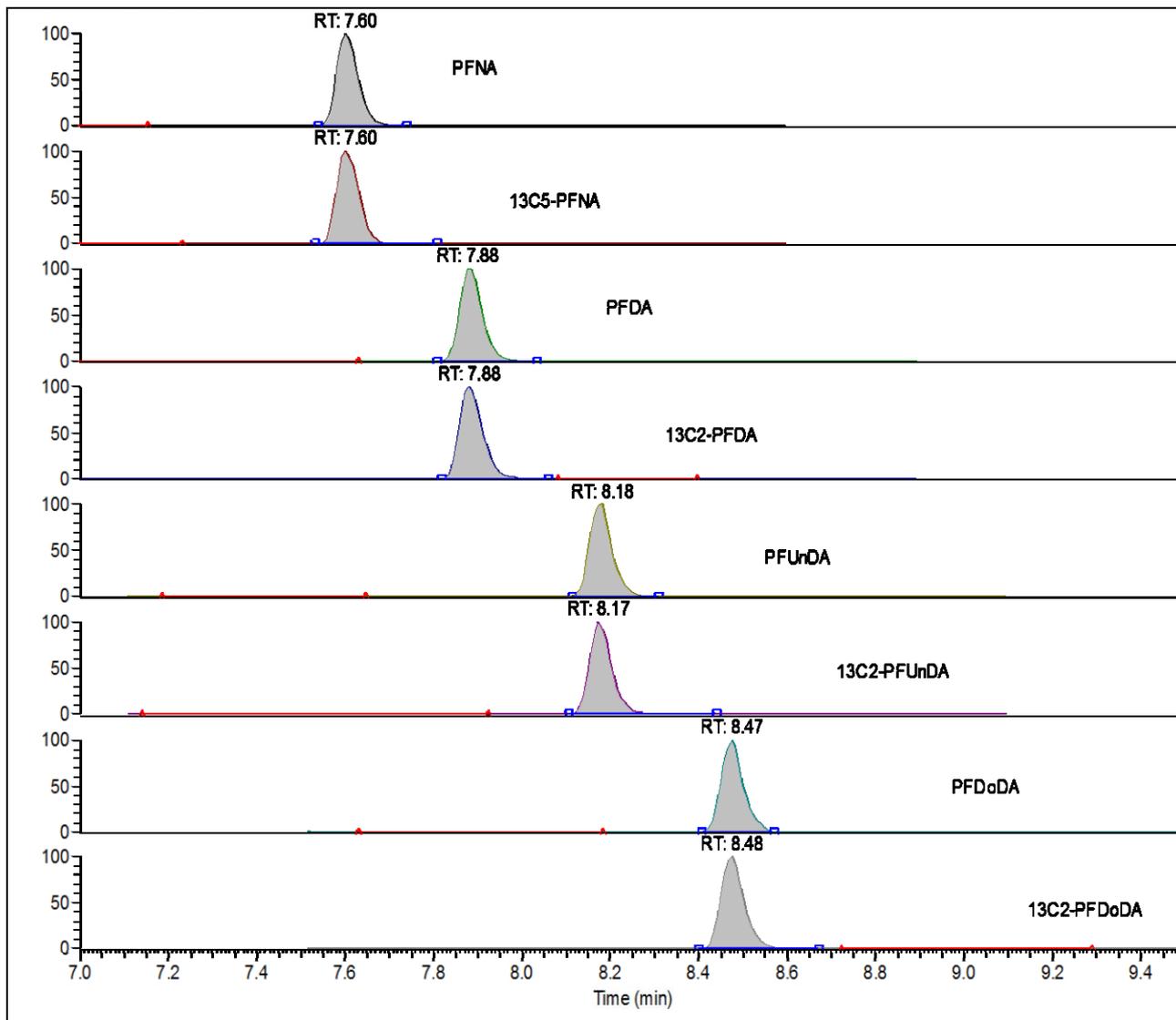


Fig. 3 - Analisi di una soluzione di riferimento di acidi perfluoroalchilcarbossilici. I cromatogrammi si riferiscono alle transizioni degli analiti e dei riferimenti marcati (SIL-IS) monitorati in modalità MRM.

Tab. 7 - Parametri di validazione (iniezione di 5 mL di soluzione e campioni acidificati)

Compo- sto	Linearità		Precisione (RSD%) ^a		Accuratezza (%)		Sensibilità (ng/L)	
	(ng/L)	R ²	Intra-day	Inter-day	TW	RW	LOD	LOQ
PFBA	LOQ-200	0,955	7-27	10-33	76	83	5,0	20
PFPeA*	LOQ-200	0,962	10-32	10-28	115	88	2,0	4
PFHxA	LOQ-200	0,969	2-8	8-33	98	103	0,2	1
PFHpA*	LOQ-200	0,970	2-9	6-14	116	111	0,2	5
PFOA	LOQ-200	0,963	1-13	8-12	91	103	0,5	3
PFNA	LOQ-200	0,960	4-12	10-16	92	119	0,5	1
PFDA	LOQ-200	0,985	10-20	16-39	110	119	0,5	1
PFUnDA	LOQ-100	0,972	10-31	24-53	119	109	0,5	1
PFDoDA	LOQ-100	0,971	10-35	30-65	134	112	1,0	2
PFBS*	LOQ-200	0,990	6-28	11-44	115	80	1,0	10
PFHxS	LOQ-200	0,970	4-13	10-25	103	103	5,0	20
PFOS	LOQ-200	0,989	8-49	14-48	87	105	2,5	10

* valori non corretti per SIL-IS; ^a (intra-day: n=3; inter-day: n=12); TW = acqua potabile; RW = acqua di fiume

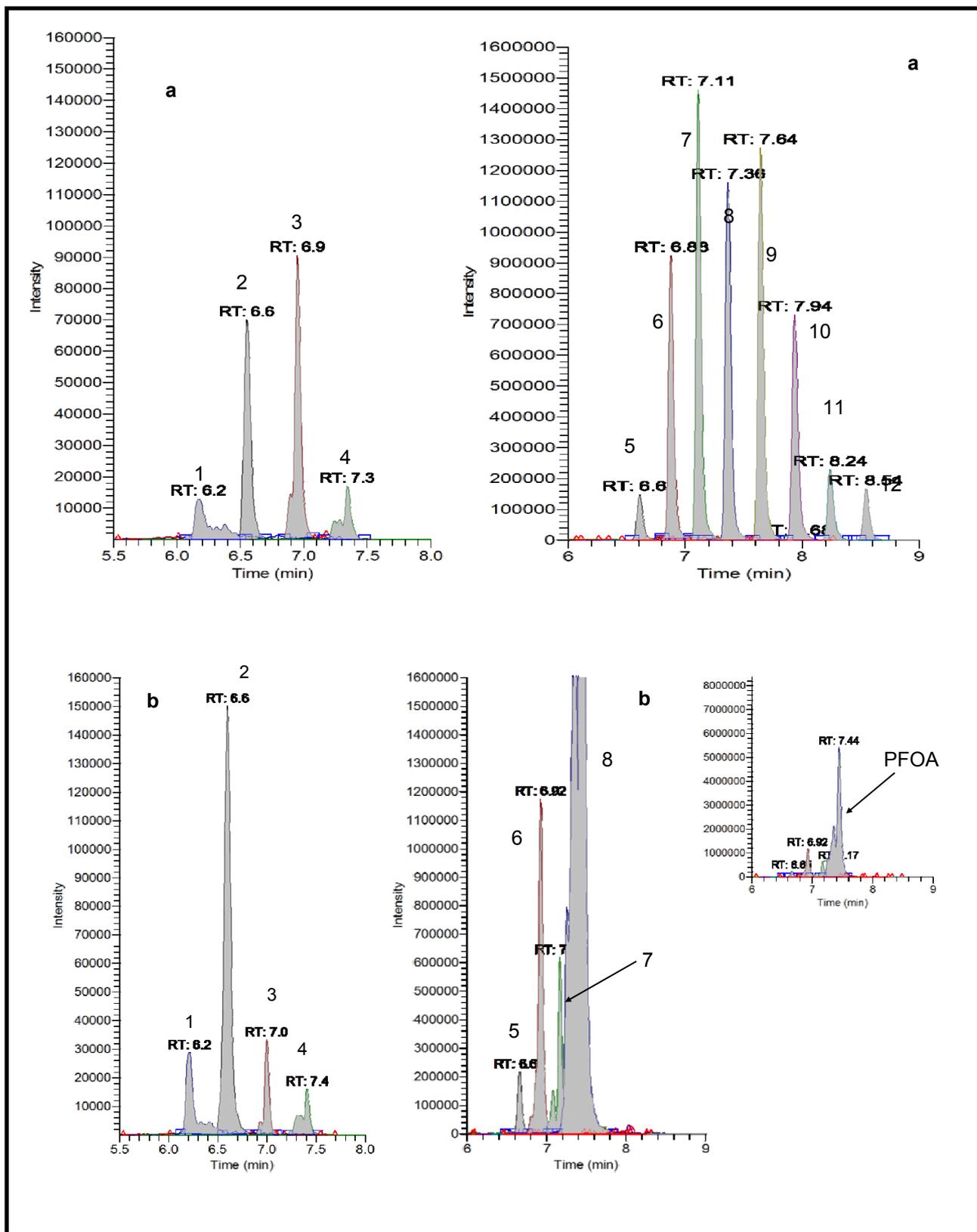


Fig. 4 - Cromatogrammi relativi alle transizioni monitorate in modalità MRM di una soluzione di riferimento di acidi perfluoroalchilcarbossilici e perfluoroalchilsolfonici (100 ng/L) (a) e di un campione di acqua potabile (b) contaminato per la presenza della maggior parte dei perfluorocomposti determinati con il presente metodo (PFBA 226 ng/L; PFBS 341 ng/L; PFHxS 35 ng/L; PFOS 90 ng/L; PFPeA 154 ng/L; PFHxA 178 ng/L; PFHpA 63 ng/L e PFOA 1529 ng/L). 1: PFBA; 2: PFBS; 3: PFHxS; 4: PFOS; 5: PFPeA; 6: PFHxA; 7: PFHpA; 8: PFOA; 9: PFNA; 10: PFDA; 11: PFUnA; 12: PFDoA. La concentrazione del PFOA è stata determinata sul campione diluito. In alto a destra è riportato il cromatogramma con la scala dell'intensità della risposta analitica cinque volte amplificata.

CONCLUSIONI

La preconcentrazione in linea (on-line SPE) del campione acquoso, accoppiata all'analisi UHPLC-ESI-MS/MS può essere utilizzata per la determinazione rapida di acidi perfluoroalchilcarbossilici e solfonici in acque dolci naturali. La manipolazione dei campioni è ridotta a un'eventuale centrifugazione per eliminare particelle che possono intasare il sistema d'iniezione e all'acidificazione del campione. Il tempo totale di analisi, comprensivo di estrazione e preconcentrazione del campione e ricondizionamento della colonna analitica, è solamente di 20 minuti. I principali vantaggi di questo metodo sono l'elevata produttività analitica, la limitata manipolazione del campione e la scarsa possibilità di errori grazie all'automazione del sistema. Questi vantaggi, unitamente ai soddisfacenti parametri della validazione (intervallo di linearità, sensibilità, precisione e accuratezza), lo rendono appropriato per una eventuale implementazione in piani di monitoraggio ambientali e sanitari.

BIBLIOGRAFIA

- GIESY J.P. & KANNAN K. (2001): "Global distribution of perfluorooctane sulfonates in wildlife", *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1339-1342.
- GIESY J.P. & KANNAN K. (2002): "Perfluorochemical surfactants in the environment", *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 146A-152A.
- KANNAN K. (2011): "Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances: current and future perspective", *Environ. Chem.*, **8**, 333-338.
- LINDSTROM A.B., STRYNAR M.J. & LIBELLO E.L. (2011): "Polyfluorinated compounds: past, present and future", *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 7954-7961.
- PREVEDOUROS K., COUSINS I.T., BUCK R.C. & KORZENIOWSKY S.H. (2006): "Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates", *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 32-44.
- BUCK R.C., FRANKLIN J., BERGER U., CONDER J.M., COUSINS I.T., DE VOOGT P., JENSEN A.A., KANNAN K., MABURY S.A. & VAN LEEUWEN S.P. (2011): "Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins", *Integrated Environ. Assess. Manag.*, **7**, 513-541.
- Commissione Europea (2006): "Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates)", *Official Journal of the European Union*, 27.12.2006, L 372/32.
- Commissione Europea (2013): "Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy", *Official Journal of the European Union*, 24.08.2013, L 226/1.
- US Environmental Protection Agency (2006): "PFOA Stewardship Program". <http://www.epa.gov/opptintr/pfoa/pubs/stewardship/pfoastewardshipbasics.html>
- US Environmental Protection Agency (2009): "Provisional Health Advisories for Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS)". http://water.epa.gov/action/advisories/drinking/upload/2009_01_15_criteria_drinking_pfoa_pfos.pdf



Criticità connesse all'applicazione della nuova Direttiva 2013/39/UE sulle sostanze prioritarie negli ambienti acquatici

a cura di Capri S.^{a*}, Polesello S.^b, Guzzella L.^b e Carere M.^c

^a IRSA-CNR, Monterotondo (RM)

^b IRSA-CNR, Brugherio (MB)

^c ISS, Roma

RIASSUNTO

La Direttiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione Europea del 12 agosto 2013, che modifica le precedenti Direttive 2000/60/CE e 2008/105/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque, introduce nuovi standard di qualità ambientali (SQA) per 12 sostanze appartenenti a diverse classi d'utilizzo (pesticidi: dicofol, quinoxifen, aclonifen, bifenoxy, cipermetrina, diclorvos, eptacloro ed eptacloro epossido, terbutrina; biocidi: cibutrina; sostanze chimiche impiegate per una vasta gamma di prodotti industriali e di consumo: acido perfluorooctansolfonico e derivati, PFOS; ritardanti di fiamma: esabromociclododecano; prodotti derivanti dalla combustione incompleta: policlorodibenzodiossine, policlorodibenzofurani e policlorobifenili "diossina simili"). L'applicazione della Direttiva evidenzia alcune possibili criticità dal punto di vista analitico. I valori di SQA fissati per le nuove sostanze, talvolta inferiori a 1 ng/L, richiedono metodologie analitiche estremamente sensibili per soddisfare i requisiti previsti dalle normative europee (limite di quantificazione, $LOQ \leq 1/3$ SQA). Inoltre l'introduzione, per alcune sostanze, di SQA per il biota richiede la messa a punto di metodi rapidi e validati per questa matrice ambientale.

SUMMARY

The Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the European Union Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy sets out environmental quality standards (EQS) for 12 new substances belonging to different classes of chemicals as pesticides (dicofol, quinoxifen, aclonifen, bifenoxy, cypermethrin, dichlorvos, heptachlor e heptachlor epoxide, terbutryn), biocides (cybutrine), chemicals used in a wide range of industrial products and supplies (perfluorooctan sulfonic acid and derivatives, PFOS), flame retardants (hexabromocyclododecane), products of incomplete combustion: (polychlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls). The implementation of the Directive highlights some analytical challenges. EQS values set for new substances, sometimes with values less than 1 ng/L, need highly sensitive analytical methods to meet European regulatory requirements (limit of quantification, $LOQ \leq 1/3$ SQA). Moreover, setting EQSs for biota requires the development of rapid and validated analytical methods for this environmental matrix.

INTRODUZIONE

La Direttiva 2013/39/UE è stata elaborata sulla base delle attività tecniche svolte in un periodo di 4 anni da parte del WG Chemical Aspects nel contesto della CIS (strategia di implementazione comune) della Direttiva Quadro Acque e dovrà essere recepita entro un periodo di due anni da parte degli Stati Membri. La Direttiva introduce una serie di novità importanti che

incideranno sui futuri programmi di monitoraggio delle sostanze chimiche negli ambienti acquatici europei, fissando altresì le tempistiche che dovranno essere rispettate nel periodo 2014-2027 (Tab. 1).

In particolare la Direttiva individua standard di qualità ambientali (SQA) per 12 nuove sostanze, che si aggiungono alle 33 sostanze incluse nella Direttiva Europea 2008/105/CE ed alle 8 sostanze dell'elenco di priorità europeo già normate dalla legislazione in vigore prima dell'emanazione della Direttiva Quadro

* capri@irsa.cnr.it

Tab. 1 - Scadenze principali e obiettivi previsti dalla Direttiva 2013/39/UE

Scadenze	Obiettivi
2014 (22 dicembre)	Elaborazione Linea guida biota
2015 (12 agosto)	Trasposizione normativa completata da parte degli Stati Membri
2015	Raggiungimento buono stato chimico per sostanze elenco di priorità direttiva 2008/105/CE
2015 (14 settembre)	Inizio Monitoraggio elenco di controllo ("watch-list")
2017 (agosto)	Proposta nuovo elenco di sostanze prioritarie europee
2017 (14 settembre)	Eventuali misure sui farmaci
2018 (22 dicembre)	Elaborazione programmi di monitoraggio supplementari e programmi preliminari di misure per le nuove sostanze prioritarie
2021 (22 dicembre)	Raggiungimento buono stato chimico per le sostanze esistenti con SQA revisionati
2027 (22 dicembre)	Raggiungimento buono stato chimico (SQA) per le nuove sostanze prioritarie

2000/60/CE per un totale di 53 sostanze, per lo più di origine organica, da tenere sotto stretto controllo nelle acque. In Tab. 2 si riporta l'elenco delle nuove sostanze prioritarie introdotte, indicando per ogni sostanza, usi o fonti principali e classificazione in base agli obiettivi di riduzione e/o eliminazione.

Di queste 12 nuove sostanze, la metà sono classificate come pericolose prioritarie (dicofol, PFOS, quinoxifen, diossine e diossine simili, esabromociclododecano, eptacloro ed eptacloro epossido) e, in quanto tali, sono soggette a provvedimenti finalizzati alla cessazione o graduale eliminazione dagli scarichi, dalle emissioni e da ogni altra perdita in modo da poter raggiungere lo stadio di emissioni zero per l'ambiente acquatico. Per alcune di queste, oltre agli SQA per le acque vengono fissati SQA per il biota (dicofol, PFOS, esabromociclododecano, eptacloro ed eptacloro epossido). Per le "Diossine" non viene fissato un SQA per le acque, ma solo per il biota, espresso in unità di tossicità equivalente (TEQ), somma di policlorodibenzo-p-diossine, PCDD, policlorodibenzofurani, PCDF e policlorobifenili diossine simili, PCB-DL. Il valore dell'SQA delle "Diossine" è uguale a quello fissato dal regolamento europeo 1881/2006/CE e successive modifiche.

La Direttiva interviene in modo rilevante anche sulle sostanze regolamentate dall'attuale Direttiva 2008/105/CE, sia attraverso una riclassificazione da sostanza prioritaria a pericolosa prioritaria per quanto concerne il di(2-etilestil)ftalato e il trifluralin, sia attraverso un abbassamento notevole degli SQA per talune sostanze causato dalle nuove evidenze scientifiche tossicologiche ed ecotossicologiche.

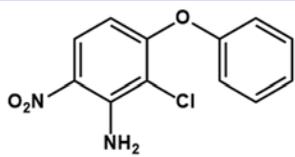
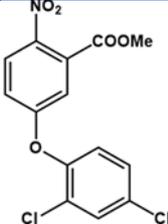
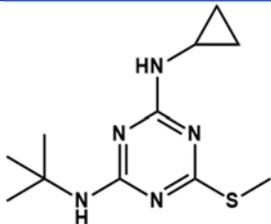
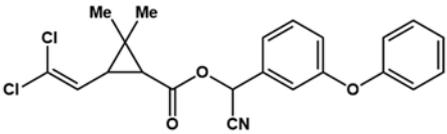
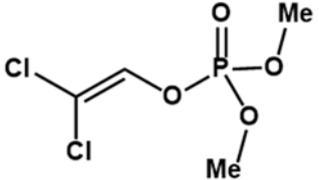
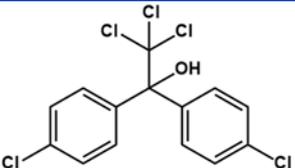
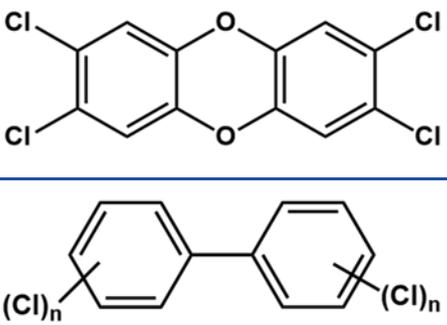
Nel paragrafo seguente si evidenziano le principali novità introdotte dalla Direttiva, analizzandole prima in linea generale attraverso un confronto puntuale con la Direttiva 2008/105/CE (Tabb. 3-5), quindi discutendo nel dettaglio, sostanza per sostanza, eventuali criticità che potrebbero sorgere in fase di applicazione dei metodi analitici disponibili.

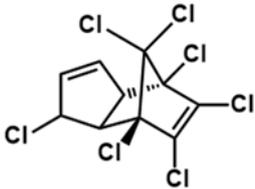
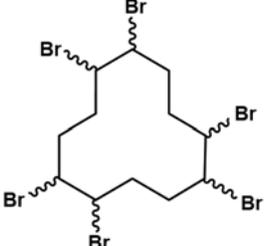
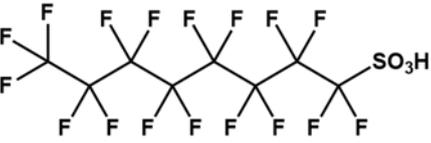
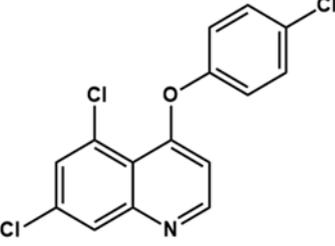
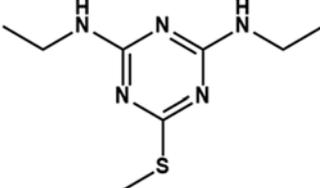
ANALISI GENERALE

Il confronto con la Direttiva 2008/105/CE evidenzia innanzitutto alcune modifiche di carattere formale come l'inversione degli allegati 1 (lista di sostanze prioritarie) e 2 (SQA) tra le due Direttive e la cancellazione e/o correzione di alcune note presenti nell'allegato 1. In particolare, per quanto concerne i difenileteri bromurati vengono definite le classi di congeneri interessate (tetra-, penta-, esa- ed eptabromurati) mentre viene cancellata la nota che assegnava al fluorantene il ruolo di "marker" di sostanze più pericolose per gli IPA, in accordo con i più bassi valori di SQA fissati dalla nuova Direttiva (0,0063 µg/L contro 0,1 µg/L). Inoltre nella nuova Direttiva è stato modificato il numero di CAS del nonilfenolo (84852-15-3) che nella Direttiva precedente 2008/105/CE faceva riferimento solo all'isomero lineare non presente in natura (CAS 104-40-5). In tal senso è stata recepita una proposta di modifica, promossa da parte dell'IRSA e trasmessa alla Commissione Europea da alcuni Paesi membri (Italia e Spagna).

Per quanto concerne la classificazione dello stato chimico, l'art. 8bis prevede che per le sostanze ubiquitarie PBT (Persistenti, Bioaccumulabili, Tossiche) contrassegnate dai numeri 5 (difenileteri bromurati), 21 (mercurio e composti), 28 (IPA), 30 (composti di tributilstagno), 35 (acido perfluoroottansolfonico e derivati), 37 (diossine e diossine simili), 43 (esabromociclododecano) e 44 (eptacloro ed eptacloro epossido), gli Stati Membri possano presentare informazioni sullo stato chimico separate da quelle relative alle restanti sostanze: tale diversa classificazione è stata prevista in quanto tali sostanze, anche se sono state messe in atto tutte le misure possibili di riduzione e/o eliminazione, a causa della loro persistenza e ubiquitarità, possono continuare a causare un declassamento dello stato di qualità di un corpo idrico. Gli Stati Membri devono però chiaramente giustificare che per queste sostanze non ci sono fonti

Tab. 2 - Nuove sostanze prioritarie introdotte dalla Direttiva 2013/39/UE

Sostanza	Formula	Usi/Fonti principali	Classificazione
Aclonifen		Erbicida appartenente alla classe dei difenileteri	Prioritaria
Bifenox		Pesticida	Prioritaria
Cibutrina (Irgarol)		Biocida utilizzato nelle vernici "antifouling"	Prioritaria
Cipermetrina		Insetticida	Prioritaria
Diclorvos		Insetticida organofosforico	Prioritaria
Dicofol		Acaricida organoclorurato	Pericolosa Prioritaria
Diossine e diossine simili (PCDD + PCDF + PCB-DL)		PCDDs e PCDF vengono rilasciati come prodotti di combustione incompleta PCB: vietato il commercio e l'uso	Pericolosa Prioritaria

Sostanza	Formula	Usi/Fonti principali	Classificazione
Eptacloro/Eptacloro epossido		Insetticida organoclorurato (vietato)	Pericolosa Prioritaria
Esabromociclododecano (HBCDD)		Ritardante di fiamma	Pericolosa Prioritaria e Convenzione di Stoccolma POP
Acido perfluorooottansolfonico (PFOS) e derivati		Prodotti di largo uso (rivestimenti tappeti, tessuti, materiali plastici), estintori e fluidi idraulici aerei, fotografia, cartiere, uso in cromatura, reflui urbani	Pericolosa Prioritaria REACH e Convenzione di Stoccolma POP (diverse restrizioni d'uso)
Quinoxifen		Fungicida	Pericolosa Prioritaria
Terbutrina		Erbicida selettivo (composto triazinico)	Prioritaria

attive di inquinamento che possano pregiudicare lo stato chimico.

L'art. 3 prevede che gli Stati Membri applichino gli SQA indicati nella parte A dell'allegato, dove, a differenza di quanto fissato dalla Direttiva 2008/105/CE, sono riportati per la prima volta, per 11 sostanze, SQA per il biota (pesci, se non diversamente indicato). L'art. 3 (commi 1, 2) prevede che gli Stati Membri possano applicare sia gli SQA sull'acqua che gli SQA sul biota. Il comma 3 lascia agli Stati Membri, come nella precedente Direttiva, la possibilità, motivando la scelta, di determinare le sostanze su matrici diverse (es. altri gruppi tassonomici di biota acquatico, sedimenti) da quelle stabilite nel comma 1, purché venga assicurato lo stesso livello di protezione e che i metodi di analisi forniscano prestazioni (incertezza estesa e limite di quantificazione) in linea con i criteri fissati

dalla Direttiva 2009/90/CE o significativamente migliori.

Un elemento di criticità riguarda la verifica dei valori degli SQA per il biota: nella direttiva mancano indicazioni pratiche sulle specie, le loro dimensioni ed età, il periodo di campionamento: tali informazioni sono utili ad aumentare la comparabilità dei risultati tra i diversi paesi, rendendo imprescindibile un'armonizzazione delle procedure. Per rispondere a questa esigenza la Commissione Europea sta coordinando un gruppo di lavoro, a cui partecipano anche ricercatori di IRSA-CNR e ISS, per l'aggiornamento della linea guida sul monitoraggio del biota (European Commission, 2010).

In Tab. 3 vengono riassunte le principali novità introdotte dalla Direttiva 2013/39/UE, rispetto all'attuale Direttiva 2008/105/CE, mentre in Tab. 4 si riportano

Tab. 3 - Novità introdotte dalla Direttiva 2013/39/UE rispetto alla Direttiva 2008/105/CE

Novità	Sostanze
Introduzione di SQA per 12 nuove sostanze prioritarie	Dicofol, quinoxifen, aclonifen, bifenox, cibutrina, cipermetrina, diclorvos, eptacloro ed eptacloro epossido, terbutrina, acido perfluorooctansolfonico e derivati, esabromociclododecano, diossine e "diossine simili"
Introduzione di SQA-MA più bassi per sostanze già normate	Fluorantene, piombo, naftalene, nichel, benzo(a)pirene
Introduzione di SQA per il biota	Difenileteri bromurati, fluorantene, benzo(a)pirene (sostanze già normate dalla Direttiva 2008/105/CE) dicofol, acido perfluorooctansolfonico e derivati, diossine e diossine simili, esabromociclododecano, eptacloro e eptacloro epossido (nuove sostanze)
Introduzione di SQA basati sulla frazione biodisponibile	Nichel, piombo (acque interne)
Introduzione di SQA-CMA in aggiunta a SQA-MA	Nichel, piombo, naftalene
Eliminazione dell'SQA-MA (valore medio annuo), ma mantenimento della SQA-CMA (concentrazione massima ammissibile) in colonna d'acqua.	Difenileteri bromurati, esaclorobenzene, esaclorobutadiene, mercurio, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(g,h,i)-perilene
Riduzione frequenza monitoraggio e classificazione separata	Sostanze ubiquitarie, persistenti, bioaccumulabili e tossiche (PBT): difenileteri bromurati, mercurio, idrocarburi policiclici aromatici, composti di tributilstagno, acido perfluorooctansolfonico e derivati, diossine e "diossine simili", esabromociclododecano, eptacloro ed eptacloro epossido
Monitoraggio di un elenco di sostanze al fine di una futura prioritizzazione ("watch list")	Obbligo di monitoraggio (diclofenac, 17-β-estradiolo, 17-α-etinilestradiolo) Sostanze scelte per l'esercizio della "watch list" (Bisfenolo A, carbamazepina e metabolita, argento, glifosato, AMPA, MBTE, triclosan, decabromodifeniletano, acido perfluoropropionico, tri-2-cloropropilfosfato, galaxolide, benzotriazolo)-non presenti nella Direttiva.

MA = media annuale; CMA = Concentrazione Massima Ammissibile

Per le seguenti sostanze prioritarie non vi sono stati cambiamenti rispetto alla Direttiva 2008/105/CE: alacloro, atrazina, benzene, cadmio, tetracloruro di carbonio, cloroalcani C₁₀-C₁₃, clorfenvinfos, clorpirifos, aldrin, dieldrin, endrin, isodrin, DDT totali, p-DDT, 1,2-dicloroetano, diclorometano, di(2-etilesil)ftalato, diuron, endosulfan, esaclorocicloesano, isoproturon, nonilfenoli, ottilfenoli, pentaclorobenzene, pentaclorofenolo, simazina, tetracloroetilene, tricloroetilene, composti di tributilstagno, triclorobenzene, triclorometano, trifluralin.

i valori di SQA fissati per le nuove sostanze prioritarie introdotte dalla Direttiva 2013/39/UE.

Un altro elemento di novità è rappresentato dalla definizione per alcune sostanze già normate dalla precedente Direttiva di valori medi annuali di SQA (AA-SQA) inferiori a quelli stabiliti dalla Direttiva 2008/105/CE, con possibili ripercussioni sui protocolli analitici da seguire nelle operazioni di monitoraggio. Tali protocolli dovranno essere adeguati in termini di sensibilità ai più stringenti requisiti imposti dalla nuova Direttiva. In Tab. 5 si riportano i valori degli SQA previsti dalle due Direttive. Il rapporto $R = \frac{SQA_{2008/105/CE}}{SQA_{2013/39/UE}}$ tra i valori di SQA previsti nelle due Direttive fornisce un'indicazione sulle criticità che potrebbero sorgere in fase di applicazione dei metodi analitici disponibili.

Tali criticità riguardano soprattutto benzo(a)pirene e idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

ANALISI DI DETTAGLIO

Sostanze prioritarie già normate dalla direttiva precedente

Idrocarburi policiclici aromatici (IPA): notevole è l'abbassamento degli SQA per queste sostanze le cui sorgenti sono per lo più diffuse, quindi di difficile controllo e riduzione. Si passa da valori di SQA compresi tra 2 e 50 ng/L della Direttiva precedente a 0,17 ng/L per tutti i congeneri elencati. Se dal punto di vista analitico potranno sorgere problemi, soprattutto per quanto riguarda la possibilità di avere bianchi ade-

Tab. 4 - Valori di SQA fissati per le nuove sostanze prioritarie introdotte dalla Direttiva 2013/39/UE

Sostanza	SQA-MA acque interne	SQA-MA altre ac- que	SQA-CMA acque in- terne	SQA-CMA altre acque	SQA biota ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso umido)
	($\mu\text{g}/\text{L}$)	($\mu\text{g}/\text{L}$)	($\mu\text{g}/\text{L}$)	($\mu\text{g}/\text{L}$)	
Dicofol	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	non applic.	non applic.	33
PFOS	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2	9,1
Quinoxifen	0,15	0,015	2,7	0,54	
“Diossine”(PCDD+PCDF+PCB-DL)			non applic.	non applic.	0,0065 TEQ*
Aclonifen	0,12	0,012	0,12	0,012	
Bifenox	0,012	0,0012	0,04	0,004	
Cibutrina	0,0025	0,0025	0,016	0,016	
Cipermetrina	8×10^{-5}	8×10^{-6}	6×10^{-4}	6×10^{-5}	
Diclorvos	6×10^{-4}	6×10^{-5}	7×10^{-4}	7×10^{-5}	
Esabromociclododecano	0,0016	0,0008	0,5	0,005	167
Eptacloro ed eptacloroepossido	2×10^{-7}	1×10^{-8}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	$6,7 \times 10^{-3}$
Terbutrina	0,065	0,0065	0,34	0,034	

* TEQ = Toxicity Equivalent Factors

Tab. 5 - Nuovi valori di SQA fissati dalla Direttiva 2013/39/UE per alcune sostanze prioritarie già normate dalla Direttiva 2008/105/CE

Sostanza	2008/105/CE		2013/39/UE		R
	SQA-MA (acque interne)	SQA-MA (altre acque)	SQA-MA (acque interne)	SQA-MA (altre acque)	
	($\mu\text{g}/\text{L}$)	($\mu\text{g}/\text{L}$)	($\mu\text{g}/\text{L}$)	($\mu\text{g}/\text{L}$)	
PBDE	5×10^{-4}	2×10^{-4}	Solo SQA-CMA ed SQA biota, 0,14 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 0,0085 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco (p.f.), rispettivamente		
Fluorantene	1×10^{-1}	1×10^{-1}	$6,3 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-3}$	16
Piombo	7,2	7,2	1,2*	1,3*	6 (5,5) **
Naftalene	2,4	1,2	2	2	1,2 (0,6) **
Nichel	20	20	4	8,6	5 (2,3) **
Benzo(a)pirene	5×10^{-2}	5×10^{-2}	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	294
Benzo(b)fluorantene	S = 3×10^{-2}	S = 3×10^{-2}	Per IPA, gli SQA-MA in acqua sono basati sulla tossicità del benzo(a)pirene		
Benzo(k)fluorantene					
Benzo(g,h,i)-perilene					
Indeno(1,2,3-cd)-pirene					S = 2×10^{-3}

*SQA espressi come concentrazione biodisponibile;

**R riferito ad altre acque; $R = \text{SQA}_{2008/105/CE} / \text{SQA}_{2013/39/UE}$

guati nei laboratori, dal punto di vista ambientale potranno esserci frequenti superamenti nei corpi idrici italiani. Concentrazioni totali (disciolto + particolato) intorno ai 50 ng/L sono stati riscontrate, ad esempio recentemente, nel tratto urbano del fiume Tevere per gli IPA indicati nella Direttiva (Patrolecco et al., 2010). *Difenileteri bromurati* (BDE): l'IRSA-CNR ha condotto alcune campagne di monitoraggio in anni recenti (dal 2004 ad oggi) in ambienti d'acqua dolce, contaminati e non, nel Nord Italia con particolare riferimento alla componente biologica (pesci, macroinvertebrati), ai sedimenti e all'acqua (Guzzella et al., 2008; Binelli et al., 2008). Per quanto riguarda la componente biologica in aree lacustri non particolarmente contaminate, es. Lago Maggiore (Guzzella et al., 2012), le concentrazioni nei pesci predatori (es. agone) variano da 5 a 10 ng/g p.f., mentre quelle dei pesci bentofagi, meno contaminati, da 0,5 a 2 ng/g p.f. Le concentrazioni in aree più antropizzate, invece, es. fiume Lambro o Po, superano i 20 e 5 ng/g p.f., rispettivamente (Viganò et al., 2008 e 2009). L'introduzione dell'SQA proposto per il biota (0,0085 ng/g p.f.), di due o tre ordini di grandezza inferiore rispetto ai valori comunemente riscontrati in ambienti acquatici, di fatto potrebbe definire tutti gli ambienti italiani appartenenti ad una qualità chimica non buona.

Per quanto concerne la disponibilità di metodiche analitiche standardizzate, con le tecniche di analisi più avanzate attualmente disponibili, è possibile quantificare, tra gli standard di qualità proposti, solo quello relativo al CMA-SQA dei Penta-BDE e non l'SQA per il biota. Infatti, le metodiche analitiche disponibili attualmente permettono di concentrare i campioni acquosi da circa 2 L a 0,1 mL di estratto con rapporti di concentrazione di circa 20.000 volte. Tali tecniche permettono di raggiungere un valore di LOD per i singoli BDE pari a 0,05 ng/L, valore che permette di quantificare con sufficiente precisione il valore di CMA-SQA per i Penta-BDE. Per quanto concerne il biota, partendo da 1-2 g di materiale biologico e raggiungendo gli stessi volumi finali, è possibile definire un LOD pari a 0,05 ng/g per ogni singolo composto che è circa un fattore 10 più elevato del valore di 0,0085 ng/g proposto come SQA per il biota, tra l'altro per la somma dei Penta-BDE.

In merito alle matrici proposte per il monitoraggio e la verifica del rispetto degli standard di qualità, considerare la matrice biologica (in particolare il pesce) per il monitoraggio dei Penta-BDE è una scelta appropriata, sia in quanto l'organismo media situazioni più a lungo termine e soffre meno delle variazioni istantanee delle concentrazioni che si verificano in acqua, sia in quanto monitora proprio quei composti che sono maggiormente bioaccumulabili.

In sintesi, si può affermare che i valori proposti introducono una serie criticità in termini applicativi sia per l'impossibilità analitica di determinare i bassi livelli richiesti sia per le ripercussioni fortemente negative che potrebbero avere sulla classificazione dei corpi idrici. L'applicazione dei limiti proposti per il biota porterebbe a definire come non buoni, dal punto di vista dello stato chimico, la maggior parte dei corpi idrici nell'Italia del Nord, mentre l'applicazione del CMA-SQA per l'acqua porterebbe a definire come in

stato chimico non buono molti degli attuali corpi idrici.

Piombo e Nichel: i valori indicati dalla proposta di Direttiva (1,2 mg/L per acque interne e 1,3 per acque marine e di transizione per Pb; 4 µg/L per le interne e 8,6 mg/L per le marine per Ni) sembrano avvicinare gli SQA ai valori tipici riscontrati in corpi idrici italiani, risultando maggiormente in linea con lo spirito della Direttiva di uno stato chimico buono come lieve disturbo dalla naturalità. Tuttavia l'SQA è riferito alla frazione biodisponibile e non alla concentrazione in fase disciolta come previsto dalla Direttiva 2008/105/CE. Non vengono per giunta fornite indicazioni su come determinare tale frazione, se per via sperimentale o attraverso l'uso di modelli. I modelli sono ancora in fase di elaborazione a livello europeo, anche se sono già disponibili quelli relativi a Ni, Pb, Cu e Zn basati su BLM (biotic ligand model) che è il modello maggiormente in uso a livello europeo che utilizza i parametri chimico-fisici DO (ossigeno disciolto) e pH. L'utilizzo di modelli di biodisponibilità per i metalli è supportata da gran parte della comunità scientifica (es. SCHER), tuttavia il ricorso alla frazione biodisponibile in sistemi, quali ad es. i fiumi, caratterizzati da grande variabilità e da una dinamica delle trasformazioni elevata potrebbe non essere sufficientemente cautelativa, inoltre tali modelli non tengono conto di fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione. Si sottolinea, infine, come il ricorso alla frazione disciolta complessiva sia più consolidata sul piano analitico.

In sintesi, l'approccio utilizzato sembra da un lato voler riavvicinare, abbassandoli, i livelli di SQA a valori sicuramente più ragionevoli per i corpi idrici, compensando tale riduzione con un incremento sul valore di picco consentito. Tale approccio risulta condivisibile, anche se l'introduzione della frazione biodisponibile comporterà sicuramente altre complicazioni per gli operatori per l'aggiunta di ulteriori parametri chimico-fisici da misurare.

Nuove sostanze introdotte

Acido perfluoroottansolfonico (PFOS) e derivati: per quanto riguarda il PFOS i limiti di quantificazione (LOQ) dei metodi disponibili sono superiori di un fattore 5-10 rispetto agli SQA proposti per le acque e richiedono perciò un adeguamento dei metodi attualmente in uso. Per quanto riguarda il limite sul biota, i LOQ dei metodi di analisi del biota sono anche 100 volte inferiori all'SQA riportato nella direttiva e non destano problemi.

Non sono disponibili metodi ufficiali italiani APAT-IRSA o ISS. È disponibile il metodo ISO 2501:2009 che si basa sull'estrazione SPE e l'analisi HPLC-MS-MS. Il campo di applicazione è 2-10.000 ng/L per PFOS e 10-10.000 ng/L per l'acido perfluorottanoico (PFOA).

Tra i metodi interni, si segnala un metodo ISS basato su SPE-HPLC-MS-MS validato per acque potabili (LOD 0,65 ng/L PFOS) e un metodo IRSA basato su un sistema automatizzato on line-SPE-HPLC-MS-MS (LOD 2,5 ng/L PFOS e 0,5 ng/L PFOA; Valsecchi et al., 2013). Come indicato, tutti i metodi disponibili si ba-

sano sulla determinazione HPLC-MS a triplo quadrupolo con limiti di rivelazione intorno o di poco inferiori al ng/L.

Per quanto riguarda le acque, gli SQA proposti, oltre ad essere difficilmente misurati, sono superati in tutto il territorio nazionale ed europeo. Benché sia stata sospesa nella maggior parte dei paesi del mondo, la produzione mondiale di PFOS e quindi le concentrazioni siano in calo, la diffusione di questa sostanza in moltissimi prodotti di uso comune e la sua persistenza fa sì che vi sia un livello di fondo ambientale spesso superiore al SQA.

Il monitoraggio delle concentrazioni di PFOS e altri composti perfluorurati nei principali bacini fluviali

italiani è stato oggetto di una specifica convenzione tra MATT (Direzione Generale per le Valutazioni ambientali) e IRSA per la realizzazione di uno studio di valutazione del Rischio Ambientale e Sanitario associato alla contaminazione da sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) nel Bacino del Po e nei principali bacini fluviali italiani. A conclusione del progetto i risultati ottenuti sono stati presentati nel corso di un convegno "I composti perfluoroalchilici (PFAS) nelle acque italiane: distribuzione e rischi", tenutosi a Milano il 22 ottobre 2013.

Terbutrina, esabromociclododecano (HBCDD): i LOQ per l'analisi di matrici sia acquose che solide (sedimenti, fanghi) sono piuttosto bassi (sub-ppb e

Tab. 6 - Informazioni su autorizzazioni, usi e presenza eventuale nei piani di monitoraggio ISPRA triennali per i nuovi pesticidi inseriti nella Direttiva 2013/39/UE

Sostanza	Autorizzazione/uso	Monitoraggio	Q = EC/SQA
aclonifen	Autorizzato fino a 31/07/2019 Erbicida	sì	133
bifenox	Autorizzato fino a 31/12/2018 Erbicida	sì	12,5
cipermetrina	Autorizzato fino a 28/02/2016 Insetticida NB: è anche un biocida, ma non più autorizzato come tale	no	375
dichlorvos	Non autorizzato può essere solo esportato (utilizzo nel Terzo Mondo) pesticida	sì	317
dicofol	Non autorizzato Acaricida	no	3385
eptacloro	Non autorizzato Insetticida	no	35000000
eptacloro epossido (metabolita dell'eptacloro)		no	100000000
quinoxifen	Autorizzato fino a 31/08/2014 Fungicida	no	93
cibutrina	Non autorizzato Biocida Prodotto 7: Preservanti per pellicole Prodotto 9: Preservanti per fibre, cuoio, gomma e materiali polimerizzati Prodotto 10: Preservanti per lavori in muratura	no	non ci sono dati ecotossicologici ufficiali
Terbutrina	Non autorizzato Erbicida	sì	41

Monitoraggio: **sì**, se è stato monitorato e riscontrato da ISPRA nei Piani di monitoraggio triennali; **no**, se è stato monitorato e non riscontrato da ISPRA ai limiti di rivelabilità indicati.

sub- $\mu\text{g}/\text{kg}$), quindi i valori proposti dalla Direttiva di SQA non comportano criticità in termini applicativi. I metodi analitici impiegano essenzialmente l'LC/MS-MS o la GC/MS-MS. Per quanto riguarda l'analisi del biota per il HBCDD non si evidenziano problemi analitici per il rispetto dell'SQA (pari a $167 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso umido). L'HBCDD, ritardante di fiamma, chimicamente è un alcano organobromurato, ciclico e non aromatico, che è stato ampiamente utilizzato come anti-fiamma nella schiuma di polistirene estruso (XEPS) od espanso (EPS) nell'industria edilizia e come uso secondario civile nei mobili, nei tessuti e nella carta da parati (De Wit, 2002).

L'HBCDD è generalmente adsorbito al particolato sospeso e/o si accumula nel sedimento. Studi sulla catena trofica acquatica hanno dimostrato che è possibile il trasferimento dal sedimento agli invertebrati e ai pesci predatori sino al bioaccumulo negli uccelli e nelle foche (Morris, 2004). Recenti indagini condotte dal CNR-IRSA (Poma et al., submitted) hanno evidenziato un valore di BMF_{TL} (Fattore di biomagnificazione normalizzato sul livello trofico) del HBCDD per una catena trofica pelagica costituita da acqua+particolato \rightarrow zooplankton \rightarrow pesci onnivori pari a 1,9, confermando l'ipotesi della sua bioaccumulabilità nella catena trofica lacustre del Lago Maggiore. Nell'Ottobre 2010 il Persistent Organic Pollutant Review Committee della Convenzione di Stoccolma ha accertato i rischi legati all'esposizione al HBCDD e ha concluso che tale composto può essere classificato come POP, perciò la Commissione ne ha raccomandato il suo totale bando (<http://chm.pops.int/>). HBCDD è stato inoltre incluso nella "San Antonio Statement on Brominated and Chlorinated Flame Retardants" siglato nel Settembre 2010 da 245 ricercatori di 22 Paesi (DiGangi et al., 2010).

Pesticidi e Biocidi (aclonifen, bifenox, cipermetrina, diclorvos, dicofol, eptacloro, eptacloro epossido, quinoxifen, cibutrina, terbutrina): alcuni pesticidi in elenco possono essere utilizzati anche come biocidi, ma le procedure di autorizzazione e le liste di inclusione sono diverse. Inoltre, alcuni pesticidi banditi in Italia ed Europa possono essere esportati sotto condizioni particolari. In Tab. 6 sono riportate informazioni riguardanti autorizzazioni, usi, presenza eventuale nei piani di monitoraggio ISPRA triennali e rapporto tra concentrazione di effetto (EC) per la specie più esigente ed il valore di SQA proposto. I dati tossicologici sono stati ricavati dalla consultazione di banche dati ufficiali europee (ESIS, FOOTPRINT).

Dall'esame della tabella si evince che si tratta in gran parte di principi attivi non più autorizzati o la cui autorizzazione scadrà al massimo entro il 2019, quindi gli effetti della contaminazione eventualmente presente dovrebbero ridursi nei prossimi anni. Per quanto concerne il confronto tra la concentrazione di effetto per la specie più esigente e l'SQA proposto, i valori degli SQA risultano di almeno due ordini di grandezza inferiori a quelli della EC, quindi ampiamente cautelativi nei confronti degli organismi, ad eccezione di bifenox e terbutrina. Appaiono decisamente bassi i valori di SQA proposti per eptacloro ed eptacloroepossido (35 milioni e 100 milioni di volte inferiori alla EC) anche se per tali sostanze gli SQA tengono conto della loro capacità di bioaccumulo.

Sostanze inserite nella Watch List

La nuova Direttiva, a seguito di una lunga discussione in seno al Consiglio Europeo, a differenza di quanto inizialmente proposto, prevede che per tre sostanze (diclofenac, farmaco anti infiammatorio; 17 α -etinilestradiolo, ormone sintetico e 17 β -estradiolo, ormone naturale) ci sia solamente un obbligo di monitoraggio al fine di adottare le eventuali misure di riduzione qualora dai risultati emergessero delle criticità. Per le sostanze farmaceutiche tuttavia la nuova direttiva prevede anche (art. 8quater) di elaborare una strategia europea complessiva (dall'immissione sul mercato fino allo smaltimento) al fine di tenere conto dell'impatto ambientale delle sostanze farmaceutiche sull'ambiente ed eventualmente adottare misure per la loro riduzione.

La Direttiva prevede altresì di individuare un elenco di sostanze per le quali è necessario raccogliere dati di monitoraggio a livello di Unione Europea, allo scopo di facilitare la definizione dei futuri elenchi di priorità ai sensi dell'art. 16, paragrafo 2 della Direttiva 2000/60/CE. Il primo elenco di controllo dovrà contenere un massimo di dieci sostanze. Gli Stati membri monitorano, per un periodo di almeno dodici mesi, ciascuna sostanza dell'elenco presso stazioni di monitoraggio selezionate come rappresentative. Per il primo elenco di controllo, il monitoraggio inizia entro il 14 settembre 2015 o entro sei mesi dall'elaborazione dell'elenco di controllo, se tale data risulta posteriore. Per l'Italia le stazioni di monitoraggio, sulla base dei criteri previsti dalla direttiva, dovranno essere almeno 20.

Attualmente è in corso un primo esercizio pilota coordinato dal JRC, a cui partecipa anche l'Italia con ISPRA e le Agenzie Regionali, del quale si attendono a breve i risultati.

CONCLUSIONI

La Direttiva 2013/39/UE riflette la consapevolezza dell'esistenza di pressioni rilevanti sull'ambiente acquatico derivanti dall'utilizzo attuale, o passato, di sostanze chimiche pericolose e della necessità di rivedere la lista di priorità alla luce di nuove acquisizioni sul piano tecnico-scientifico. L'apertura ai contaminanti cosiddetti emergenti (ormoni, farmaci, PFOS, HBCDD) è da valutare positivamente in quanto riflette, come testimoniato dal gran numero di lavori pubblicati in questi ultimi anni, le indicazioni del mondo scientifico sulla loro importanza, sia in termini di frequenza di rilevamento nei corpi idrici che di effetti esercitati sulla salute umana e sugli ecosistemi.

È indubbio che i valori di SQA proposti per le nuove sostanze comporteranno, in generale, delle criticità nell'ambito delle operazioni di controllo. Se consideriamo, in prima approssimazione, la soglia di $1 \text{ ng}/\text{L}$ di SQA come valore al di sopra del quale i metodi attualmente disponibili, pur con qualche necessario adeguamento, sono in grado di soddisfare i requisiti imposti dalla Direttiva, si può ragionevolmente affermare che per cipermetrina, dicofol, diclorvos, eptacloro ed eptacloro epossido i valori di SQA sono lontani dai LOQ raggiungibili. Per le sostanze già normate dalla precedente Direttiva, difenileteri bromurati

ed IPA presentano analoghe criticità. Bisogna altresì tenere presente che, come discusso in precedenza, anche quando applicabili i metodi analitici per queste sostanze non sono gestibili su base routinaria, ma richiedono apparecchiature sofisticate e personale altamente qualificato. Per quanto riguarda il biota, non esistono poi metodi normati e validati a livello europeo, ma esistono metodi sviluppati, ad esempio, per i controlli previsti dal Regolamento 1881/2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Questi metodi normalmente sono validati per il rispetto di valori

soglia per l'edibilità che risultano, ad esclusione delle "Diossine" e del "Benzo(a)pirene", di alcuni ordini di grandezza più elevati di quelli proposti dalla Direttiva. La proposta di Direttiva pone quindi come urgente la messa a punto e lo sviluppo di metodi analitici che consentano la verifica del rispetto degli SQA e la definizione, attraverso la scelta delle matrici su cui effettuare le determinazioni analitiche, di strategie di monitoraggio "intelligenti" che permettano di massimizzare le informazioni a costi sostenibili.

BIBLIOGRAFIA

BINELLI A., GUZZELLA L. & ROSCIOLI C. (2008): "Levels and congener profiles of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Zebra mussels (*D. polymorpha*) from Lake Maggiore (Italy)", *Environ. Pollut.*, **153**, 610-617.

De WIT C.A. (2002): "An overview of brominated flame retardants in the environment", *Chemosphere*, **46**, 583-624.

DIGANGI J., BLUM A., BERGMAN A., De WIT C.A., LUCAS D., MORTIMER D., SCHECTER M., SHAW S.D. & WEBSTER T.F. (2010): "Editorial: San Antonio Statement on brominated and chlorinated flame retardants", *Environ. Health Perspective*, **118**, 516-518.

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 (pubblicata nella G.U. n. L 327/1 del 22/12/2000).

DIRETTIVA 2008/105/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive del Consiglio 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE, nonché modifica della direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio.

DIRETTIVA 2013/39/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 12 agosto 2013 che modifica le direttive 2000/60/CE e 2008/105/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque.

EUROPEAN UNION (2010): "Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC) Guidance Document No. 25 Guidance on chemical monitoring of sediment and biota under the Water Framework Directive", Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2010 ISBN 978-92-79-16224-4 (Downloadable from <http://circa.europa.eu>) (editors S. Polesello, V. Dulio, G. Hanke, M.Carere).

GUZZELLA L., ROSCIOLI C. & BINELLI A. (2008): "Contamination by Polybrominated Diphenyl Ethers of sediments from the Lake Maggiore basin (Italy and Switzerland)", *Chemosphere*, **73**, 1684-1691.

GUZZELLA L., POMA G. & ROSCIOLI C. (2012): "Indagini sul comparto ittico. Analisi dei contaminanti organici. CIP AIS - Monitoraggio della presenza di DDT ed altri contaminanti nell'ecosistema Lago Maggiore", *Rapporto Annuale 2011*, 86-93 pp.

MORRIS S. et al. (2004): "Distribution and Fate of HBCD and TBBPA Flame Retardants in North Sea Estuaries and Aquatic Food Webs", *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 5497-5504.

PATROLECCO L., ADEMOLLO N., CAPRI S., PAGNOTTA R. & POLESELLO S. (2010): "Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the Tiber River (Italy)", *Chemosphere*, **81**, 1386-1392.

POMA G., VOLTA P., ROSCIOLI C., BETTINETTI R. & GUZZELLA L. "Concentrations and trophic interactions of novel brominated flame retardants, HBCD e PBDEs in zooplankton and fish from Lake Maggiore (Northern Italy)", *Submitted to Environmental Pollution*.

REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, L 364/5 del 20/12/2006.

VALSECCHI S., MAZZONI M. & POLESELLO S. (2013): "Analisi multiresiduale LC-MS mediante arricchimento in linea del campione (on-line SPE/UHPLC-ESI-MS/MS) per la determinazione di acidi perfluoroalchilcarbossilati e perfluoroalchilsolfonati nelle acque dolci naturali", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, dicembre 2013, 2-12.

VIGANÒ L., ROSCIOLI C., ERRATICO C., GUZZELLA L. & FARKAS A. (2009): "Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Gammarids, Caddisflies, and Bed Sediments of the Lowland River Po", *B. Environ. Contam. Tox.*, **82**, 200-205.

VIGANÒ L., ROSCIOLI C., ERRATICO C., GUZZELLA L. (2008): "Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in 0+ juvenile cyprinids and sediments of the Po River", *Arch. Environ. Contam. Tox.*, **55**, 282-294.



Studio di processi abiotici che influenzano la speciazione e circolazione del selenio in sistemi acquatici

XXVI ciclo di Dottorato in Scienze Applicate
alla Protezione dell'Ambiente e dei Beni Culturali,
Sapienza Università di Roma
Dottorando: Dr. Francesca Gennari

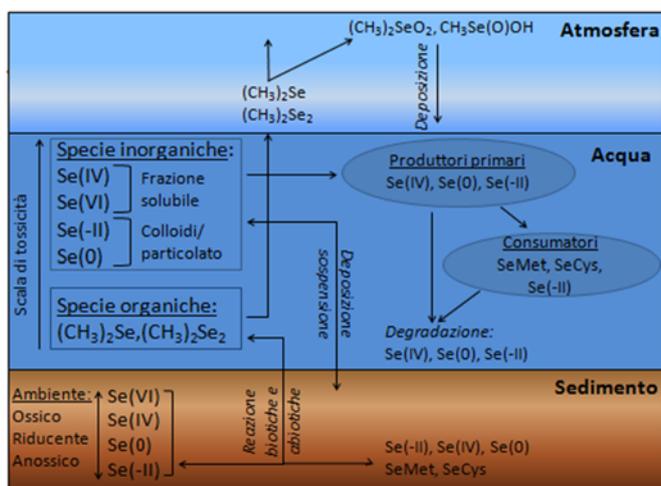
Il selenio è un oligoelemento i cui effetti benefici si esplicano solo in un ristretto intervallo di concentrazione. Una carenza dell'elemento può portare ad una serie di malattie acute e croniche e concentrazioni leggermente superiori al ristretto intervallo ottimale nell'organismo esplicano un'azione tossica fino a produrre effetti di tipo cancerogeno e teratogeno. Alle dosi ottimali il selenio è importante per il corretto funzionamento di molti processi metabolici e per la sua capacità di aumentare l'azione di antiossidanti.

Il selenio è un elemento con ottime proprietà fotovoltaiche e fotoconduttive e pertanto è stato ampiamente impiegato in elettronica, nelle fotocellule e nelle celle fotovoltaiche. L'elemento è tuttora utilizzato nell'industria della ceramica e del vetro, in quanto può impartire una colorazione rossa a vetri e smalti. Composti del selenio trovano applicazione come inibitori di ossidazione per oli lubrificanti e per migliorare la resistenza all'abrasione della gomma vulcanizzata. Un altro impiego dell'elemento è nella fotografia e nell'industria farmaceutica, in particolare in alcuni preparati per il cuoio

capelluto, per curare dermatiti nei cani e in alcuni integratori alimentari.

L'elemento esiste in natura in quattro stati di ossidazione: Se^{-2} ; Se^0 ; Se^{+4} e Se^{+6} , cui corrispondono specie del selenio con differenze marcate nel comportamento chimico, nella capacità di interazione con gli organismi acquatici e l'uomo e negli effetti ambientali. I composti organici del selenio sono meno tossici di quelli inorganici e, tra i composti inorganici, il $\text{Se}(\text{IV})$ è la forma dell'elemento più tossica e reattiva.

Le concentrazioni di selenio nelle acque in genere sono basse, ma sorgenti di contaminazione (eruzioni vulcaniche, combustione di combustibili fossili, incenerimento di rifiuti urbani e industriali, utilizzo massiccio di fertilizzanti e mangimi addizionati di selenio) possono incrementare considerevolmente tali valori.



La comprensione dei fenomeni di mobilizzazione del selenio richiede la conoscenza da un lato delle proprietà delle varie specie dell'elemento in circolazione in fase liquida e solida e dall'altro dei processi responsabili del decadimento delle specie meno mobili e della produzione di quelle più mobili. In questo quadro complesso di interazioni possibili le reazioni abiotiche possono esercitare un ruolo importante nella circolazione biogeochimica dell'elemento nei sistemi acquatici.

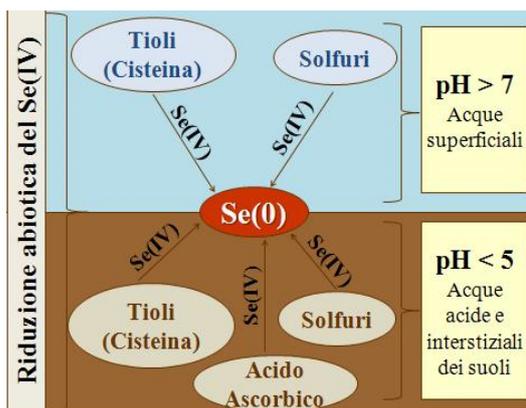
Data la crescente attenzione rivolta alla presenza di selenio elementare nelle acque per la sua scarsa mobilità e capacità di interagire con il biota e l'elevata tossicità del $\text{Se}(\text{IV})$ si è ritenuto opportuno affrontare lo studio della cinetica di riduzione del $\text{Se}(\text{IV})$ a $\text{Se}(\text{O})$ con riducenti di rilevanza ambientale (solfuri, acido ascorbico e cisteina) in funzione delle principali variabili quali pH, temperatura e forza ionica.

News

L'insieme dei risultati acquisiti ha consentito di sviluppare espressioni per il calcolo delle costanti cinetiche specifiche che consentono di stimare il tempo di dimezzamento del Se(IV) in presenza dei riducenti scelti in un'ampia gamma di condizioni sperimentali (pH, temperatura, forza ionica) tipiche delle acque superficiali e profonde.

I risultati ottenuti in campioni sintetici sono stati sostanzialmente confermati in matrici reali, suggerendo quali reazioni abbiano un ruolo importante nei sistemi acquatici naturali. Si è potuto concludere che solfuro e cisteina giocano un ruolo importante in differenti condizioni ambientali (sia in acque acide che alcaline caratterizzate da condizioni di ipo/anossia). Al contrario l'acido ascorbico sembra avere una rilevanza ambientale significativa solo

a bassi valori di pH (< 5), riscontrabili nelle acque interstiziali di suoli acidi (poveri di carbonati o dove è stato fatto un uso ingente di fertilizzanti) o in acque superficiali interessate da fenomeni naturali e/o antropici di acidificazione.



I risultati di questo studio hanno consentito inoltre di valutare l'eventuale possibilità di utilizzare i riducenti scelti nella bonifica e nel trattamento di acque contaminate da Se(IV). I tempi di dimezzamento stimati sono stati confrontati con i risultati di alcuni processi biologici e chimico-fisici applicati al trattamento e bonifica delle acque contaminate da Se(IV). Il confronto incoraggia l'eventuale utilizzo dei riducenti in questione nel trattamento di scarichi industriali e nella bonifica *in situ* di suoli e acque sotterranee caratterizzate da elevate concentrazioni di Se(IV), anche in considerazione del fatto che l'uso di sostanze di origine naturale, come solfuro, acido ascorbico e cisteina comporta ridotti effetti negativi per l'ambiente.

zione del fatto che l'uso di sostanze di origine naturale, come solfuro, acido ascorbico e cisteina comporta ridotti effetti negativi per l'ambiente.

Tutor esterno: Dr. Maurizio Pettine, pettine@irsa.cnr.it

Relatore: Prof. Luigi Campanella, luigi.campanella@uniroma1.it



Biodegradazione di una miscela binaria di composti xenobiotici, in un reattore SBR operante in modalità TPPB con fase di partizione costituita da un polimero commerciale e da un polimero di scarto

Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica

Anno 2012-2013

Laureando: Ing. Veronica Campanelli

BACKGROUND

Nel settore della rimozione biologica dei composti xenobiotici, una promettente soluzione tecnologica, che consente di ridurre i fenomeni di tossicità da substrato e al tempo stesso garantire cinetiche di reazione accettabili per l'applicazione, è costituita dai reattori TPPB ("Two Phase Partitioning Bioreactors") operanti con fase di partizione costituita da una fase polimerica biocompatibile con la biomassa ed in grado di immagazzinare elevate quantità dei composti da rimuovere. I composti inquinanti infatti si distribuiscono, in funzione del coefficiente di partizione, tra la fase acquosa e la fase di partizione in modo tale da far sì che, anche se al reattore vengano alimentate elevate quantità di composti xenobiotici, i microrganismi siano esposti a ridotti livelli di concentrazione. Inoltre, la quantità di substrato fornito alla biomassa è determinata unicamente dai processi metabolici, infatti, quando il substrato viene consumato nella fase acquosa, la necessità di ristabilire l'equilibrio termodinamico nel sistema causa il trasferimento del composto xenobiotico dalla fase di partizione a quella acquosa in modo ottimale in quanto direttamente dipendente dalla cinetica di biodegradazione.

RISULTATI OTTENUTI

La sperimentazione è stata condotta applicando diverse condizioni operative: SBR ("Single Batch Reactor"), TPPB con fase sequestrante costituita da pneumatici di scarto, TPPB con pneumatici di scarto e un polimero commerciale (Hytrel). In particolare, è stata dimostrata l'efficacia del sistema bifasico nella rimozione di un composto altamente tossico, il 2,4-diclorofenolo, caratterizzato da una cinetica di biodegradazione lenta e

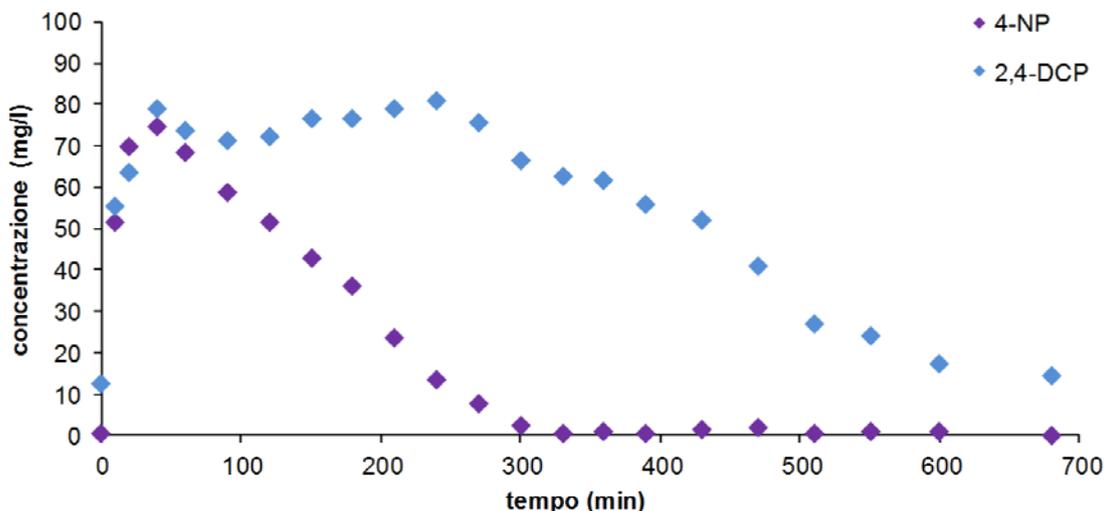


Fig 1 - Cinetica di biodegradazione $C_{0,2,4-DCP} = 166 \text{ mg/L}$ e $C_{0,4-NP} = 150 \text{ mg/L}$

News

nettamente inibita, come si può evincere dal confronto tra i parametri cinetici di tale inquinante e quelli di un altro xenobiotico, il 4-nitrofenolo, composto che si è dimostrato caratterizzato da una cinetica di rimozione maggiormente rapida e meno inibita (Fig. 1).

Nell'ambito della scelta dei polimeri da adottare come fase sequestrante, la decisione di impiegare pneumatici di scarto in forma granulare ha fornito risultati incoraggianti. Infatti, le prestazioni di questo materiale si sono mostrate paragonabili, anche se ovviamente inferiori, a quelle di polimeri commerciali appositamente preparati, il cui costo è nettamente superiore a quello irrisorio del pneumatico stesso. Inoltre, è stata investigata e successivamente avvalorata la possibilità di trattare, mediante sistemi bifasici, anche soluzioni acquose contenenti diversi xenobiotici che costituiscono ovviamente un substrato sintetico maggiormente simile ad un refluo industriale reale. Si è infine modulata la capacità di assorbimento della fase polimerica, utilizzando contemporaneamente polimeri diversi nel sistema a doppia fase. La combinazione di un polimero commerciale, presente in minor quantità, e di un pneumatico usato, ha consentito di ottimizzare efficacemente le prestazioni del sistema TPPB, con la riduzione dei costi operativi dovuta all'utilizzo di un prodotto di scarto (Fig. 2).

Parallelamente è stato sviluppato un modello che, partendo dalla descrizione fisica dei fenomeni di assorbimento/desorbimento e dall'analisi delle cinetiche di biodegradazione dei composti xenobiotici in miscela, consente di simulare il processo e quindi di ottimizzarlo, guidando nella scelta dei polimeri da utilizzare e della durata del ciclo reattivo.

Relatore : Prof.ssa Maria Cristina Annesini, annesini@uniroma1.it

Correlatore : Ing. Maria Concetta Tomei, tomei@irsa.cnr.it

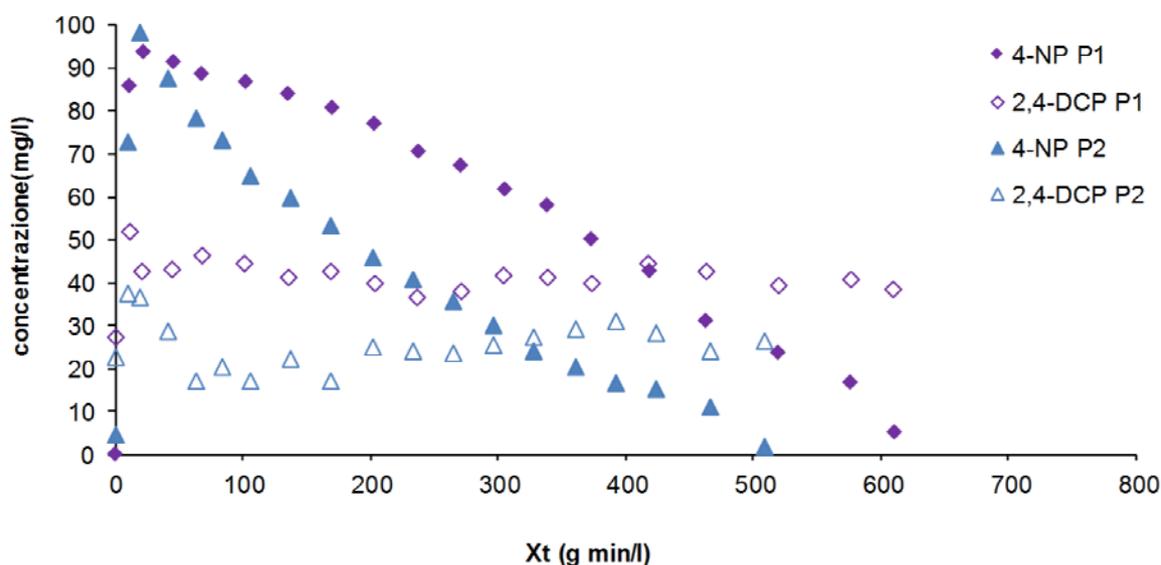


Fig. 2 - Confronto tra le prestazioni del sistema bifasico con solo pneumatico (prova P1) e bifasico con miscela di polimeri (prova P2)



Novel processing routes for effective sewage sludge management

Il progetto europeo ROUTES, iniziato a maggio 2011 con durata tre anni, è stato finanziato sul VII programma Quadro ed è coordinato dall'Ing. Giuseppe Minnini dell'IRSA.

Nel progetto, con forte valenza tecnologica, sono sviluppate alcune tecniche innovative per la gestione efficace ed efficiente dei fanghi prodotti negli impianti di trattamento delle acque reflue urbane di cui sono valutate la sostenibilità tecnica, economica e ambientale al fine di una loro applicazione sugli impianti in scala reale di differente potenzialità. Il progetto è articolato in sette "Work Package", caratterizzati da forti correlazioni.

I principali obiettivi del progetto sono:

- il miglioramento della qualità dei fanghi ai fini di un loro recupero agricolo con riferimento a numerosi parametri che comprendono oltre alla stabilità biologica anche patogeni, microinquinanti organici e inorganici, eco-tossicità e fito-tossicità,
- la minimizzazione della quantità di fanghi prodotta;
- il recupero di risorse (fertilizzanti, biopolimeri, metano);
- lo sviluppo di un processo di ossidazione a umido dei fanghi integrato con il trattamento della corrente liquida di risulta a elevato carico organico.



Nel WP1 (preparazione per l'utilizzo) le attività sono rivolte alla valutazione e ottimizzazione di processi di pre-trattamento dei fanghi a monte della digestione anaerobica da applicare su impianti di medie e grandi dimensioni, finalizzati alla produzione di fanghi di elevata qualità da destinare all'uso agricolo. Un pre-trattamento termico a 135°C con digestione termofila ha permesso di raggiungere una rimozione del 45% dei solidi volatili (SV) dei fanghi

secondari con produzione di biogas di 0,8 Nm³/kg SV rimossi. In queste condizioni i fanghi presentano ottime caratteristiche igienico-sanitarie per quanto riguarda la presenza di *Salmonella spp*, *E. coli* e colifagi somatici (indicatori di virus). Interessanti sono stati anche i risultati di un processo combinato di digestione anaerobica mesofila e di post stabilizzazione aerobica avente lo scopo di massimizzare l'abbattimento di SV che, dopo digestione, è stato incrementato ulteriormente del 25 e 45% con fanghi secondari e misti, rispettivamente. Sono state mantenute buone prestazioni per i parametri igienico-sanitari, sebbene leggermente inferiori a quelle

News

conseguite con i processi di pre-trattamento termico e digestione termofila.

Nel WP2 sono sviluppati tre processi di minimizzazione della produzione di fanghi, due per il recupero di biopolimeri e solfato di ammonio, rispettivamente, ed uno per la trasformazione dei fanghi in prodotti inerti. Molto efficace è risultata l'applicazione di un reattore sequenziale a biomassa adesa con produzione di biomassa granulare (SBBGR) che ha consentito di abbattere il COD in ingresso di un refluvo civile ad alto carico del 90% riducendo complessivamente la produzione di fanghi di oltre il 75%. Con un processo MBR accoppiato con un trattamento anaerobico su una parte della corrente di riciclo la riduzione della produzione dei fanghi è risultata pari al 23%. Molto interessante è stata, poi, l'applicazione di un processo di trattamento dello scarico urbano mediante celle microbiche elettrolitiche: con carico organico di circa 1 g COD/(L × d) soltanto il 7% del COD rimosso come acetato è stato convertito in biomassa (produzione di fanghi estremamente ridotta). Questo processo risulta molto utile anche ai fini di un'efficiente conversione del COD in metano. I poliidrossialcanoati (PHA) sono poliesteri biodegradabili con proprietà confrontabili ad alcune poliolefine prodotte da prodotti petroliferi. La produzione di questi biopolimeri è stata ottenuta utilizzando colture miste prodotte nel trattamento di acque di scarico e fanghi, riducendo significativamente i costi di produzione. Nel trattamento dei fanghi per via anaerobica una significativa percentuale di azoto della biomassa è rilasciata in soluzione con conseguente appesantimento delle condizioni di carico della linea acque, dove sono riciclate le correnti liquide separate nella disidratazione meccanica dei fanghi. Queste correnti liquide, perciò, dovrebbero essere trattate in modo da recuperare l'azoto ivi presente che costituisce una risorsa. Nel progetto è stata messa a punto una tecnica di stripping dell'ammoniaca su un impianto in piena scala previa alcalinizzazione della stessa. Per minimizzare i consumi di soda necessari è stata utilizzata una preventiva colonna di stripping della CO₂ che ha consentito di ridurre del 50% i consumi di soda. Test di ossidazione a umido in laboratorio su sette tipologie di fanghi hanno evidenziato che il parametro principale del processo è la temperatura. I parametri ottimizzati sono risultati temperatura 250 °C, pressione parziale di O₂ 22 bar, tempo di contatto 1 h, concentrazione di solidi di alimentazione 8%.

Nel WP3 sono sviluppati processi in scala reale o pilota. Oltre all'ossidazione a umido e al recupero di (NH₄)₂SO₄ di cui si è già parlato nel WP2 è stata studiata l'operazione di pompaggio dei fanghi che può trovare importanti applicazioni ai fini del trattamento centralizzato evitando il trasporto su gomma. In questi casi può essere conveniente un pretrattamento meccanico o termico per migliorare le caratteristiche reologiche che consentireb-

News

bero di pompare fanghi a più elevata concentrazione di solidi con conseguenti risparmi energetici. Inoltre, in questo WP è stato sviluppato un processo in un impianto in piena scala di controllo della produzione di fanghi ricorrendo a cicli alternati sia in linea acque per l'abbattimento dell'azoto sia in linea fanghi sulla corrente di riciclo.

Il WP4, unico work package non tecnologico, è rivolto a valutare gli effetti potenzialmente dannosi in termini di fito-tossicità ed eco-tossicità dovuti all'uso dei fanghi di depurazione in agricoltura e a studiare il destino dei contaminanti (metalli e microinquinanti organici) nei suoli ammendati con fanghi. Esperimenti in colonna hanno dimostrato che la solubilità del nichel è correlata al tasso di applicazione dei fanghi e soprattutto al contenuto di carbonio organico disciolto nell'eluato. Sono stati condotti test in batch per comprendere il meccanismo di trasformazione nel suolo del climbazolo nei suoi prodotti, in condizioni aerobiche e anaerobiche, nonché per valutare l'influenza dell'uso di fanghi e delle differenti proprietà del suolo sulle proprietà di assorbimento e degradazione di altri sette microinquinanti organici. Si è evidenziato che il principale prodotto di trasformazione del climbazolo è relativamente stabile nel suolo e che la somma dei due è costante per un periodo di tempo di circa 100 giorni. I test di ecotossicità e fitotossicità richiedono ulteriori approfondimenti onde evitare che risultati positivi del test possano dipendere da problemi di trasparenza o da presenza di colorazione.

Il progetto, che la Commissione Europea ha voluto fortemente dedicato alla soluzione di problemi reali e ricorrenti, comprende una parte significativa di analisi tecnico-economica dove dieci linee di trattamento innovative (comprendenti i processi sviluppati nei WP1, 2 e 3) sono confrontate con linee convenzionali (benchmarking). La valutazione del ciclo di vita (LCA) correda le valutazioni tecnico-economiche in riferimento agli aspetti ambientali. Questa parte del progetto è sviluppata nel WP5.

I WP6 e 7 sono dedicati, rispettivamente, alla diffusione dei risultati e alla gestione del progetto.

Giuseppe Mininni, mininni@irsa.cnr.it

Andrea Sbrilli, sbrilli@irsa.cnr.it



La disinfezione delle acque reflue e l'impatto sulla comunità microbica

a cura di Guzzella L.^{a*}, Masotti L.^b e Verlicchi P.^b

^a IRSA-CNR, Brugherio (MB)

^b Università di Ferrara

Una recente richiesta di chiarimento giunta lo scorso mese di ottobre 2013 dalla Provincia di Pescara, Servizio Tutela dell'Ambiente e Protezione Civile (prot. U-2013-0264903 del 03/10/2013), in relazione all'applicazione dei test di tossicità con il batterio *Vibrio fischeri* ad acque di scarico disinfettate con prodotti a base di cloro, ci ha permesso di affrontare e discutere un *problema ambientale emergente* legato alla diffusa pratica di trattamento di disinfezione delle acque reflue e, quindi, al relativo potenziale impatto tossicologico sulla popolazione microbica presente nel corpo idrico ricettore.

Il quesito formulato riguardava la modalità di conduzione del test con batterio *Vibrio fischeri* su reflui in uscita da impianti di depurazione (Metodo 8030 pubblicato sul Quaderno Metodi analitici per le acque APAT/CNR-IRSA n. 29 del 2003). In particolare, chiedeva se:

- 1) nel caso di acque disinfettate con prodotti a base di cloro, sia necessario effettuare, come previsto dal metodo, una neutralizzazione del cloro presente mediante aggiunta di tiosolfato per eliminare l'interferenza dovuta al cloro residuo;
- 2) nel caso il campione di effluente non dechlorato risulti tossico al test, ma lo stesso campione sottoposto a dechlorazione non lo sia più, l'effluente non dechlorato sia da considerarsi tossico o no; e infine
- 3) tale superamento sia sanzionabile sulla base del titolo V del D. Lgs. 152/06.



Per chiarezza va sottolineato che il D. Lgs. 152/06 per quanto concerne i limiti di emissione degli scarichi idrici in acque superficiali o in fognatura prevede l'esecuzione obbligatoria di un saggio di tossicità acuta. Oltre al saggio sul crostaceo *Daphnia magna*, possono essere eseguiti saggi di tossicità acuta su altri organismi test, tra cui i batteri bioluminescenti (nota 5 alla Tab. 3 dell'Allegato 5 del D. Lgs. 152/06). Il saggio di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* ha trovato ampia diffusione sia presso le strutture di controllo (ARPA, APPA, ecc.) che presso le aziende per gli autocontrolli interni proprio per le caratteristiche di rapidità, sensibilità e riproducibilità che lo contraddistinguono. Essendo l'organismo test un batterio, va sottolineato, come riportato nel manuale APAT-IRSA (2003) Metodo 8030 Valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti, nel paragrafo "Interferenze e cause di errore", che la presenza di cloro attivo nello scarico, diminuendo la vitalità dei batteri, può influire significativamente sul risultato del saggio. Nel metodo viene anche descritto il protocollo da seguire per eliminare la suddetta interferenza con aggiunta di tiosolfato. Anche gli Standard Methods (APHA, 2012) prescrivono di ricorrere, se necessario, all'eliminazione del cloro aggiungendo al campione sodio solfito.

Va tuttavia evidenziato che la positività del test di tossicità previsto dalla Tab. 3 dell'Allegato 5 del D. Lgs. 152/06 non prevede l'applicazione diretta delle sanzioni di cui al Titolo V, ma determina da parte degli organi di controllo l'obbligo di approfondimento analitico per l'individuazione degli analiti responsabili della tossicità al fine di rimuoverne le cause.

L'eventuale positività al test con *Vibrio fischeri* senza la neutralizzazione del cloro confrontata con una sua eventuale negatività dopo il trattamento di rimozione del cloro evidenzia la presenza, nello scarico, di una tossicità residua legata alla presenza del cloro attivo che potrebbe interferire sulla

* guzzella@irsa.cnr.it

In breve

vitalità della comunità microbica a valle dell'immissione dello scarico nel corpo idrico.

Nel corpo idrico che riceve lo scarico si attivano spontaneamente processi di tipo chimico, fisico e biologico di diluizione, dispersione e "autodepurazione" che mitigano eventuali effetti negativi dovuti alle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche dell'immissione stessa.

Gli effetti negativi potrebbero essere più evidenti in caso di elevate portate scaricate in corpi idrici con scarse capacità di diluizione. Questo scenario può verificarsi anche solo occasionalmente, quando per esempio il corpo ricevente in alcuni periodi dell'anno ha portate estremamente ridotte.

In questi casi si può assistere ad una "alterazione" delle caratteristiche chimiche e biologiche di tratti del corpo idrico a valle dell'immissione con anche potenziali effetti mutageni e teratogeni legati allo sviluppo di prodotti organici secondari a base di cloro (es. clorometani, cloro aniline, cloro benzeni, ecc.). In tali casi sarebbe utile per l'autorità preposta al controllo degli scarichi consigliare ai gestori degli impianti stessi alcune possibili accortezze che possano facilitare la rimozione del cloro residuo attivo prima dell'immissione nel corpo idrico recettore.

Una prima possibilità consisterebbe nel richiedere la dechlorazione all'interno dell'impianto di depurazione mediante aggiunta in linea di tiosolfato prima di avviare l'effluente trattato allo scarico, pratica molto diffusa in America.

Laddove possibile, si potrebbero realizzare piccoli saltelli d'acqua nel tratto finale del canale di scarico prima della sua immissione nel corpo idrico o prevedere nel tratto finale dello scarico tratti aperti, proprio al fine di salvaguardare la comunità microbiologica e lasciando ai processi di autodepurazione del corpo idrico la mitigazione finale.

Altra soluzione potrebbe essere quella di ricorrere a disinfettanti alternativi al cloro, utilizzando per esempio l'acido peracetico o la radiazione UV, come suggerisce l'esperienza inglese (Stanfield, 1995).

Si ritiene quindi che l'eliminazione del cloro mediante l'aggiunta di tiosolfato possa essere considerata non solo una pratica di esecuzione del saggio con *Vibrio fischeri* corretta dal punto di vista dell'eliminazione dell'interferenza da cloro nel campione, ma anche una procedura utile per evidenziare eventuali cause di tossicità presenti nello scarico, la cui rilevanza andrà valutata in funzione della destinazione dello scarico stesso (es. scarico in fognatura o in corpo idrico) e per valutare l'impatto sulla comunità microbica a valle dello scarico.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (2012): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XXII Ed., (Washington, APHA), 8050 Method "Bacterial bioluminescence", 8-38/8-41.

APAT/CNR-IRSA (2003): "Metodi analitici per le acque", n. 29/ 2003, Metodo 8030, 1003-1012.

MASOTTI L. (2011): "Depurazione delle acque", Ed. Calderini, Bologna, 674-684.

STANFIELD G. (1996): "Alternative choices for disinfection", Proceedings of the 1st European Symposium "Chlorine dioxide and disinfection", Roma, 7-8 Novembre 1996.



Automazione ed analisi ambientale

a cura di Campanella L.*

Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma

L'automazione rappresenta oggi nel laboratorio una via per migliorare produttività e qualità.

I chips microfluidici stanno divenendo il nuovo paradigma per l'analisi chimica in laboratorio. Nanocapillari costruiti in substrati planari usando la tecnologia del silicio si avviano a sostituire beakers e tubature per il trasporto e la manipolazione dei liquidi a livello dei sub microlitri. Diametri ridotti significano anche ridotto uso di agenti e di reagenti, migliorata qualità analitica, tempi più brevi di analisi ed accresciuto campo applicativo.

Un altro sviluppo di questi anni riguarda l'uso di microstrutture quali i micro reattori per la sintesi chimica per applicazioni varie, dalla chimica combinatoria alla produzione industriale su vasta scala. Nanoreattori a livello del singolo enzima (volumi inferiori agli attolitri) consentono di realizzare reazioni enzimatiche con un solo enzima nel volume di misura. La nanofluidica è perciò una tecnologia potenzialmente in grado di cambiare in modo fondamentale la nostra percezione delle scienze chimiche e della vita.

Un microdispensatore è fabbricato in silicio con un trasduttore piezo elettrico. Una piccola goccia del volume di 50 picolitri è capace, attraverso operazioni multiple, di provocare un arricchimento al quale corrisponde un segnale che può essere mediato attraverso l'uso di un cromatografo liquido annesso al dispensatore. Per muovere piccole quantità di liquido dai contenitori di conservazione al reattore si può applicare il principio della goccia acustica. Una grande varietà di solventi, DNA, proteine, cellule in un volume dell'ordine dei microlitri possono essere così trasportate senza apprezzabile perdita di attività o di vitalità. Un trasduttore è accoppiato al fondo di microcapsule per produrre ultrasuoni capaci senza contatto di provocare la formazione di una goccia di soluzione o, analogamente, di volumi maggiori per lavaggi, mescolamenti, aggiunta di reattivi, risparmiando anche sui volumi da smaltire.

Il LabCD è una piattaforma microfluidica centrifuga che usa una forza centrifuga su un disco rotante per pompare o somministrare liquidi.

Uno dei grandi vantaggi di un test deve essere quello della velocità della risposta, soprattutto in medicina. Ciò spesso provoca un contrasto fra qualità e rapidità rinunciando alla prima per la seconda. Ci si chiede cosa sia meglio per il paziente. In effetti molto spesso la ridotta qualità analitica non deriva dalle caratteristiche del test ma dagli operatori non usi a tecnologie tanto innovative. Il dilemma suddetto pertanto merita come prima importante risposta quella di una più attenta formazione del personale addetto e descrizione molto più accurata e dettagliata dei relativi protocolli. Ci sono peraltro approcci per ridurre gli errori: un sistema qualità

* luigi.campanella@uniroma1.it

In breve

appropriato per le infrastrutture, metodi di controllo del sistema accurati, implementazione delle misure, computerizzazione dei dati; finora non molto si fa in questa direzione.

Lo scattering della luce di risonanza da parte di particelle è stato applicato a molti biotest. Queste particelle colloidali, per lo più metalliche, di nano-dimensioni irradiano energia come luce dispersa a seguito di illuminazione con luce bianca. Lo scattering della luce ha proprietà che sono controllate dalla dimensione delle particelle nonché dalla loro forma e composizione e sono prevedibili secondo appropriati algoritmi. Il segnale di luce prodotto da una singola particella è da 10^4 a 10^6 volte maggiore del segnale ottenuto attraverso i comuni fluorofori, con in più il vantaggio di non decadere né essere estinti. La superficie delle particelle può essere derivatizzata con differenti biomolecole che possono poi, legandosi con molecole bersaglio, produrre effetti specifici. Gli oggetti biologici vengono intrappolati mediante un metodo deelektroforetico usando costrizioni geometriche fatte di materiali fabbricati mediante processi litografici. La costrizione è necessaria per costringere il campo elettrico in una soluzione conduttrice, come tamponi di forza ionica, così creando un gradiente di alto campo con un massimo locale. Cellule di batterio possono essere intrappolate e separate in flusso da cellule di sangue.

Il “nanospray” (lo spray caratterizzato cioè da flussi molto bassi rispetto ai valori convenzionali) è tecnica poco robusta e poco riproducibile. Molto di questo comportamento risulta come una conseguenza dell’elevato numero di “spray modes” possibili a basse velocità. Quando questa tecnica è accoppiata alla cromatografia a gradiente la stabilità risulta in ogni caso complicata dalla variazione della tensione superficiale, della viscosità e della conducibilità della fase mobile. Piuttosto che usare la corrente ionica come monitor delle prestazioni dello spray vengono monitorate la geometria del cono, il getto e la coda ortogonalmente allo spettrometro di massa. Quelli descritti sono alcuni dei moderni sviluppi dell’analisi automatica dei quali quella finalizzata al controllo ambientale comincia a raccogliere i frutti in termini di prestazioni e di sofisticazioni strumentali.

In breve



SPECIAL SILVER ANNIVERSARY: 25th EDITION!!!!

25th International Specialized Course
25° Corso Internazionale di Specializzazione

**“OPERATION AND CONTROL OF ACTIVATED SLUDGE PROCESSES USING
MICROBIOLOGICAL ANALYSIS”**

**“CONTROLLO E GESTIONE DEL PROCESSO A FANGHI ATTIVI TRAMITE
METODI MICROBIOLOGICI”**

Perugia (Italy), Villa Umbra, loc. Pila. **16-20**

June\Giugno 2014

Il processo a fanghi attivi è tuttora il più utilizzato dei metodi biologici per il trattamento delle acque di scarico per la sua versatilità (rimozione del carbonio, dei nutrienti, degli inquinanti organici, dei patogeni, etc.). Nuove modificazioni del processo sono oggi ampiamente utilizzate, quali i Reattori Sequenziali (SBR), i Bioreattori a Membrana (MBR) ed i Bioreattori a Letto Mobile (MBBR), i fanghi granulari etc..

Esattamente quando il Processo a fanghi attivi compie “100 Anni” dal suo primo utilizzo, questo tradizionale Corso arriva alla sua 25° Edizione, ed organizzerà quindi una **Edizione Speciale**; verrà chiesto ai Docenti di presentare “cosa è oggi noto” sui fondamentali aspetti del Processo, oltre che delineare quello che rappresenta il futuro del processo. Tutti i partecipanti alle precedenti 24 Edizioni (1990-2013) sono invitati a partecipare, così come chiunque è coinvolto in questa tecnologia, come consulenti, operatori e tecnici di impianto, organi di controllo, studenti, etc.. Il Corso mantiene la sua originale struttura, organizzata in due Moduli:

I – Modulo Base: Aspetti di Processo: due giorni di presentazioni e discussioni su un ampio spettro di problematiche:

- Componenti Microbici del fango attivo: osservazione microscopica tradizionale e biomolecolare
- Componenti Microbici del fango attivo sulla base dei recenti studi di “omica”
- I Protozoi come indicatori. Una visione critica di decenni di studi.
- Strategie di controllo del processo tramite metodi tradizionali ed innovativi di fenomeni di “bulking” e “foaming”
- Realizzare l’impianto: dalle cinetiche al dimensionamento dei reattori
- Il sedimentatore secondario: dalla Teoria del flusso solido al funzionamento del sedimentatore secondario

In breve

- Corretta Identificazione dei batteri Filamentosi e delle rilevanti popolazioni microbiche mediante Microscopia in Epifluorescenza
- “Casi di Studio”. Questa sessione nelle sue passate Edizioni, ha normalmente registrato ampio interesse. Questo anno, riceverà particolare attenzione, con brevi illustrazioni di Casi di Studio, da parte dei Partecipanti, con discussione comune con il corpo Docente delle possibili soluzioni.
- Il futuro del Processo: applicazioni delle nuove tecnologie correlate (Bioreattori a Membrane, Processo Anammox, Fango granulare, Bioreattori a letto mobile)

II - Modulo Specialistico: Due giornate e mezzo per l'identificazione microscopica delle principali popolazioni filamentose presenti nel fango attivo tramite microscopia tradizionale, ed una dimostrazione della tecnica FISH (ibridazione fluorescente in situ), ai fini del controllo del processo e delle disfunzioni. Il Corso è mirato a chi vuole ricavare informazioni applicabili dirette utilizzando un semplice microscopio ottico, in vista di un futuro approfondimento attraverso la tecnica della FISH.

Durante il lavoro in laboratorio il gruppo docente sarà assistito da tutors.

Informazioni: www.irsacnr.it in eventi; tandoi@irsacnr.it



Notiziario dei Metodi Analitici IRSA News

Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Direzione e Redazione

Istituto di Ricerca sulle Acque, Area della Ricerca RM1, Montelibretti, via Salaria km 29+300.
C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)
Telefono: 06 90672 850 Fax: 06 90672 787 e-mail: direzione@irsa.cnr.it

Direttore responsabile

Maurizio Pettine

Comitato di Redazione

L. Campanella, S. Capri, L. Guzzella, G. Mascolo, S. Polesello

Segreteria di Redazione

S. Ghergo

<http://www.irsa.cnr.it/Notiziario>