



In questo numero:

Saggio con l'ostracode *Heterocypris incongruens*: applicazione per la valutazione ecotossicologica di terre e rocce da scavo trattate con agenti schiumogeni **3**

Messa a punto di una metodica analitica in HPLC-MS/MS e relativi metodi di estrazione per la determinazione di miscele di antibiotici in matrici complesse **14**

Determinazione del metilmercurio in sedimenti e biota d'acqua dolce mediante Analizzatore Automatico di Mercurio e GC-MS **20**

Caratterizzazione di un refluo civile per la determinazione delle variabili di INPUT del modello ASM1 **30**

News:

Il Progetto Parchi Verbano Ticino: verifica e sperimentazione di scenari di gestione sostenibili e condivisi **37**

Approccio metodologico per valutare le miscele di sostanze chimiche negli ecosistemi: un progetto in sinergia con il Ministero dell'Ambiente **39**

Editoriale

Con questo primo numero del 2020 salutiamo e ringraziamo il Comitato di Redazione che in questi anni ha con tanta passione accompagnato la produzione editoriale e la pubblicazione di questo strumento editoriale del nostro Istituto. L'ingresso dei colleghi di Pallanza e Taranto nella struttura dell'IRSA ha reso necessaria una revisione della composizione del Comitato di Redazione che dovrà rappresentare anche le nuove "anime" del nostro istituto che ha ampliato e innovato con l'inserimento di molti nuovi colleghi le sue attività. È in corso perciò un processo di rinnovamento del Notiziario, che coinvolge anche il Consiglio d'Istituto, per portarlo ad essere un più efficace e moderno strumento di discussione e disseminazione dei risultati che otteniamo nella nostra ricerca. Il Direttore Responsabile, dott. Giuseppe Mascolo, avendo assunto anche il ruolo di Direttore d'Istituto, verrà affiancato da un Direttore Scientifico che coordini le attività del nuovo Comitato di Redazione. Giuseppe mi ha proposto per questo incarico (e perciò lo ringrazio) ed è in questa veste che firmo questo editoriale.

Come ormai tradizione di questa rivista, che ha l'ambizione di rappresentare la multidisciplinarietà che dalla fondazione è alla base delle attività dell'IRSA, in questo numero troviamo la presentazione di metodi biologici, chimici e modellistici. Nel primo articolo viene riportata l'applicazione di un test ecotossicologico con il crostaceo ostracode *Heterocypris incongruens* a terre e rocce prodotte durante lo scavo meccanizzato di gallerie sotterranee, per il quale è previsto l'utilizzo di prodotti commerciali schiumogeni. Questa tematica ha un grande impatto diretto sulle attività cantieristica di scavo e dimostra l'attitudine dei ricercatori IRSA a tradurre la conoscenza scientifica in azioni con una ricaduta concreta sulla realtà socio-economiche e sulla protezione ambientale del nostro Paese. Nel contributo seguente si affronta un metodo analitico con strumentazione HPLC-MS a triplo quadrupolo per la determinazione di due classi di antibiotici, fluorochinoloni e sulfonamidi, sia da matrici solide (suolo, digestato) che liquide (acqua fluviale). Il tema della misura ambientale degli antibiotici ha ormai assunto una rilevanza primaria nell'ambito degli studi sulla diffusione ambientali di geni portatori di resistenza agli antibiotici. Questo lavoro risponde alla necessità di mettere a disposizione alla ricerca e al controllo ambientale metodi accurati e sensibili per la misura di questa classe di inquinanti inclusi tra

quelli di interesse emergente. L'attenzione su queste tematiche cosiddette emergenti non ci deve far dimenticare che le sostanze persistenti da noi immesse nel comparto acquatico nei decenni scorsi rappresentano ancora una sorgente primaria di rischio per gli ecosistemi acquatici. Lo studio dei processi di biomagnificazione del mercurio negli organismi acquatici richiede la disponibilità di misure di speciazione di questo metallo, come il metodo presentato in questo numero per la determinazione di metilmercurio (MeHg), un composto del mercurio più tossico e bioaccumulabile rispetto alle forme inorganiche. Scopo di questo lavoro è sviluppare e confrontare due protocolli per l'analisi del MeHg in campioni di organismi e di sedimenti d'acqua dolce, mediante Analizzatore Automatico di Mercurio in assorbimento atomico e GC-MS.

La modellizzazione matematica degli impianti di trattamento delle acque reflue civili presenta grandi potenzialità in termini di ottimizzazione dei processi, sia al fine della riduzione dei costi che dell'individuazione degli aspetti critici di una determinata configurazione impiantistica. Tuttavia questo strumento fatica ad imporsi presso i gestori, per via della apparente complessità di utilizzo dei modelli, a partire da quello maggiormente diffuso: l'*Activated Sludge Model* n° 1. Per ovviare a questa apparente complessità, l'ultimo articolo del nostro Notiziario descrive una procedura per individuare le variabili di input del modello mediante una serie di parametri comunemente monitorati in impianto ed una prova respirometrica.

Questo numero, come consuetudine, si conclude con la breve presentazione di eventi e progetti. Tra questi abbiamo la presentazione del progetto Il Progetto Parchi Verbano Ticino, finanziato nell'ambito del Programma di Cooperazione INTERREG V-A ITALIA-SVIZZERA 2014 – 2020 per la definizione di strategie di gestione ambientale realizzabili, sostenibili, condivise ed esportabili in contesti analoghi dell'area alpina e dei risultati finali dell'accordo di collaborazione tra il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare e l'IRSA-CNR per l'individuazione di un approccio metodologico per valutare le miscele negli ecosistemi, un tema di rilevanza assoluta nei processi di valutazione del rischio a livello di Unione Europea.

Stefano Polesello
Direttore Scientifico



Saggio con l'ostracode *Heterocypris incongruens*: applicazione per la valutazione ecotossicologica di terre e rocce da scavo trattate con agenti schiumogeni

a cura di

Livia Mariani, Anna Barra Caracciolo, Paola Grenni (*), Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Roma

RIASSUNTO

La valutazione della contaminazione multipla (da sostanze normate ed emergenti) di matrici ambientali (acqua, suolo, sedimenti) è ad oggi una delle sfide più importanti della comunità scientifica al fine di proporre delle metodologie utili non solo per la determinazione simultanea di più contaminanti, ma anche per valutare i possibili effetti sull'ecosistema. A tal fine, i test ecotossicologici applicati a matrici reali sono uno strumento valido che fornisce informazioni sulle miscele di sostanze chimiche presenti nell'ambiente.

Nell'articolo viene riportata un'applicazione del test con il crostaceo ostracode *Heterocypris incongruens* a terre e rocce prodotte durante lo scavo meccanizzato di gallerie sotterranee, per il quale è previsto l'utilizzo di prodotti commerciali schiumogeni. L'organismo test è una specie autoctona e, vivendo nell'interfacies acqua-suolo, è risultato adatto a valutare i possibili effetti delle concentrazioni residuali di tensioattivi anionici contenuti nei prodotti utilizzati nelle attività di scavo.

SUMMARY

The evaluation of different contaminants (regulated and emerging substances) in environmental matrices (water, soil, sediments) is today one of the most important challenges for the scientific community. Useful methodologies for chemical analyses of different contaminants and for evaluating their possible effects on ecosystems need to be found. Ecotoxicological tests performed on matrices in real study cases are a valid tool for obtaining information on chemical mixtures in the environment.

In this paper, the application of the test with *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda) to excavated soil from mechanized tunnelling, in which commercial foaming agents are used, is reported. The test organism is an autochthonous species; it lives in the water-soil interface and therefore is particularly suitable for assessing the possible effects of residual concentrations of the anionic surfactants of foaming agents used in excavated soils.

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ecotossicologia per la valutazione delle miscele

L'ecotossicologia è una scienza trasversale ed integra la chimica ambientale (che studia il trasporto, il movimento e le trasformazioni delle sostanze chimiche nei diversi comparti ambientali), la tossicologia ambientale (che fornisce strumenti per la valutazione del danno a livello di sistemi biologici complessi come la comunità) e l'ecologia (che indica quali sono i processi chiave che caratterizzano i diversi sistemi e le relazioni che intercorrono tra gli organismi ed il sistema abiotico che li ospita). In ecologia e in ecotossicologia, l'obiettivo non è la protezione dei singoli individui, ma quello di proteggere i livelli gerarchici più elevati (popolazione, comunità). L'obiettivo dell'ecotossicologia è dunque comprendere e predire gli effetti degli agenti chimici o fisici inquinanti sulle comunità naturali in condizioni di esposizione realistiche (Chapman, 2002). In senso pratico, si traduce nell'esecuzione in laboratorio di test di tossicità su uno o più componenti di un ecosistema, allo scopo di tutelarli con un ap-

proccio precauzionale. Lo strumento per misurare l'effetto nocivo di una sostanza o miscela di composti tossici su un sistema biologico è il saggio o test ecotossicologico. In generale, tali procedure consistono nell'esporre una o più specie di organismi viventi, in condizioni sperimentali controllate e per un tempo determinato, ad una o più sostanze in concentrazione nota o incognita, allo scopo di verificare se si manifestano effetti tossici (Baudo et al., 2011). L'effetto (endpoint) è la compromissione di una o più funzioni vitali (sopravvivenza, motilità, crescita, ecc.) valutato sulla porzione degli organismi che risponde all'esposizione del tossico o del campione (Bacci e Marchetti, 2008). Gli organismi possono essere esposti a differenti concentrazioni o dosi di una sostanza pura, di un prodotto commerciale o di un campione ambientale (acqua di scarico, fango di depurazione, suolo, sedimento fluviale o marino), in funzione dell'obiettivo.

La novità di questa strumentazione è la sua portabilità: questa funzione ne consente l'uso in luoghi remoti utilizzando una batteria per auto come alimentatore e l'aria ambiente come gas di trasporto. Questo dispositivo è stato sviluppato nell'ambito del progetto europeo MERCYMS (un approccio integrato per valutare il

* grenni@irsa.cnr.it

L'immissione nell'ambiente di miscele di contaminanti può generare fattori di stress a diversi livelli di organizzazione biologica dell'ecosistema. Le interazioni tra le diverse sostanze e gli effetti sugli ecosistemi, inoltre, sono spesso poco conosciuti. L'ecotossicologia ha un ruolo rilevante nella valutazione delle miscele di sostanze chimiche (OECD, 2018; EFSA, 2019) anche per la gestione e la comprensione di potenziali effetti avversi derivanti dall'esposizione multipla ai contaminanti. La caratterizzazione chimica non consente, da sola, di esprimere valutazioni relative al pericolo per gli organismi viventi, né di determinare la relazione tra la tossicità della matrice e gli effetti sul biota. I test ecotossicologici sono pertanto uno strumento molto utile per analizzare le matrici ambientali in cui è presente una miscela di composti. Infatti, a prescindere dal numero di contaminanti determinati con le analisi chimiche, gli organismi testati risponderanno con un effetto che rifletterà la presenza di tutti i componenti della matrice (anche quelli non noti); tale effetto sarà il risultato delle diverse interazioni che avverranno tra i vari chemicals che potranno essere di tipo additivo, sinergico o antagonista. Dunque, i test ecotossicologici sono lo strumento più idoneo per valutare l'impatto di una miscela di sostanze chimiche ignote o conosciute in un campione ambientale (SCHER, SCCS, SCENIHR, 2012).

1.2 L'ecotossicologia per la valutazione delle miscele

Le terre e rocce da scavo sono il materiale derivante dallo scavo di gallerie sotterranee e di grandi opere ingegneristiche. Negli ultimi 30 anni, la tecnologia connessa agli scavi si è evoluta rapidamente grazie all'introduzione sul mercato di macchine di perforazione (frese) più efficienti e sicure. Rispetto ai metodi di scavo convenzionali, lo scavo meccanizzato ha diversi vantaggi quali il funzionamento continuo della macchina e con maggior velocità, condizioni di lavoro più sicure, minori cedimenti in superficie (subsidenza).

In particolare, la realizzazione di gallerie mediante scavo meccanizzato con macchine del tipo Tunnel Boring Machine-Earth Pressure Balance (TBM-EPB, Foto 1) garantisce la stabilità del fronte di scavo, migliorando di conseguenza le condizioni di sicurezza degli operatori (Vinai et al., 2008).

Le frese TBM-EPB richiedono l'utilizzo di prodotti schiumogeni ed eventualmente di additivi (schiume e polimeri) che ne ottimizzano la performance. Tali prodotti, utilizzati per il condizionamento del terreno, riducono l'attrito, l'abrasività e la permeabilità dello stesso, aumentandone la lavorabilità e duttilità. La scelta dei prodotti da utilizzare e dei relativi parametri di condizionamento sono specifici per ogni tipo di terreno scavato, in funzione delle sue proprietà (Peila, 2014).

I principali parametri di condizionamento sono (EFNARC 2005):

- la concentrazione dell'agente tensioattivo in acqua, % in volume (C_f) = $100 \times m_{\text{tensioattivo}}/m_{\text{schiuma}}$;
- la massa del tensioattivo nella soluzione schiu-



Foto 1. Immagine di una fresa meccanica di tipo TBM-EPB.

mosa ($m_{\text{tensioattivo}}$); la massa della soluzione schiumosa (m_{schiuma}); solitamente la sua concentrazione si aggira intorno al 3% e dipende dalla quantità di acqua presente nel suolo;

- FER (*Foam Expansion Ratio*, rapporto di espansione schiuma) = volume della schiuma nella camera di condizionamento/volume della soluzione schiumosa. Maggiore è il suo valore più asciutta sarà la schiuma;
- FIR (*Foam Injection Ratio*, rapporto di iniezione schiuma, % in volume) = $100 \times \text{volume schiuma nella camera di condizionamento/volume terreno}$. Rappresenta il valore del consumo effettivo di schiuma per m^3 di terreno trattato;
- TR (*Treatment Ratio*, L/m^3), esprime il volume di agente schiumogeno in litri utilizzato per metro cubo di terreno scavato ed è calcolato in funzione degli altri parametri:

$$TR = \frac{FIR}{100} \cdot \frac{1}{FER} \cdot \frac{C_f}{100} \cdot 1000$$

Questo parametro in particolare viene utilizzato per calcolare la quantità di agente schiumogeno, in mg/kg, attesa nel terreno.

Numerosi agenti schiumogeni utilizzati per lo scavo meccanizzato sono soluzioni acquose contenenti tensioattivi anionici in percentuale variabile, come per esempio il sodio lauril etere solfato (SLES). I tensioattivi anionici sono un gruppo eterogeneo di sostanze chimiche che, grazie alle loro caratteristiche, sono utilizzate in una vasta gamma di prodotti commerciali. Sono costituiti da una testa polare solubile in acqua e da code idrofobiche non polari prevalentemente lineari (lunghezza tra C8 e C18, Barra Caracciolo et al., 2017). Il terreno scavato con la TBM-EPB è dunque costituito da frammenti di rocce o di terreno di varie dimensioni e le schiume.

In Italia, la realizzazione di gallerie con la produzione di volumi di terreno maggiori di 6000 m^3 (cd. cantieri

di grandi dimensioni, sottoposti a VIA o AIA), richiede la presentazione di un Piano di utilizzo terre (PUT). La normativa (D.M. 161/2012; D.P.R. 120/2017) prevede che il materiale prodotto durante lo scavo possa essere riutilizzato come sottoprodotto (es. riempimento di cave o di avvallamenti, pavimentazione di strade, realizzazione di argini), se non vengono superate le Concentrazioni Soglia di Contaminazione (CSC, D.lgs 152/2006, Tab. A e B) riferite alla specifica destinazione urbanistica del sito di produzione e destinazione del sottoprodotto o dei valori di fondo naturale. Nel caso di superamento dei valori delle CSC, il materiale viene classificato come rifiuto.

Le terre e rocce da scavo classificate come rifiuto aumentano considerevolmente il costo di realizzazione della galleria per il loro smaltimento in discariche specializzate, occupando altro suolo che oggi è ritenuto una risorsa preziosa, non rinnovabile. La possibilità che ingenti quantità di questi sottoprodotti siano invece considerati risorse opportunamente riciclabili rappresenta un esempio di applicazione di economia circolare (Oreste e Castellano, 2012; Bellopede et al., 2011; Tokgöz, 2013). Tuttavia, nel riutilizzo di tali sottoprodotti, deve essere sempre garantita la protezione ambientale del sito di destinazione, accertando che non vi sia alcun impatto dovuto alla presenza di eventuali residui di schiumogeni.

Ad oggi le schede tecniche dei prodotti commerciali utilizzati non riportano informazioni sugli effetti ecotossicologici, a breve e lungo termine, delle schiume e si limitano a riportare (e non sempre in modo completo) le caratteristiche e l'etichettatura delle sostanze principali in esse contenute. Ad oggi non è stato definito un quadro normativo esaustivo riguardante la caratterizzazione chimica ed ecotossicologica delle terre e rocce da scavo trattate con gli agenti schiumogeni, né a livello italiano né internazionale (Mininni et al., 2019). Ne consegue una criticità operativa nel valutare e gestire in maniera adeguata le terre e rocce da scavo da un punto di vista ambientale (Barra Caracciolo et al., 2017; Grenni et al., 2018; Grenni et al., 2019). Per esempio i tensioattivi anionici non sono considerati dalla normativa vigente tra le sostanze da analizzare al fine di poter considerare il terreno scavato un sottoprodotto; tuttavia in diversi casi è stato sollevato, dall'autorità competente, il problema della presenza di concentrazioni residuali di tali composti nel terreno ed il loro eventuale impatto sull'ambiente. In particolare, nel caso di additivi contenenti sostanze chimiche non elencate nella normativa, deve essere inviato un documento tecnico alle autorità italiane competenti che dimostri che i suoli scavati non rappresentano un rischio per la salute ambientale e umana (Padulosi et al., 2019; Grenni et al., 2019).

Studi recenti in microcosmi di laboratorio hanno valutato l'ecotossicità di diversi terreni provenienti da scavi con EPB-TBM e condizionati con vari prodotti commerciali contenenti lo SLES come componente principale (Grenni et al., 2018; Finizio et al., 2019). Tali sperimentazioni hanno permesso di valutare il possibile riutilizzo dei terreni come sottoprodotto. A diversi tempi sperimentali sono stati utilizzati campioni di terreno e i corrispondenti estratti acquosi per valutare

gli effetti degli agenti schiumogeni con diverse specie test (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lepidium sativum*, *Daphnia magna*, *Heterocypris incongruens*, *Danio rerio* ecc.). I risultati ecotossicologici sono stati confrontati con le concentrazioni residue di SLES nel terreno o negli estratti acquosi. Tali studi hanno dimostrato che lo SLES degrada nei terreni condizionati e che alcuni organismi acquatici risultano più sensibili di quelli terrestri. Inoltre è stato evidenziato che il rilascio dello SLES nella fase acquosa del terreno (elutriato) nonché i tassi di degradazione di questo tensioattivo sono variabili in funzione del tipo di terreno e di schiumogeno utilizzato e, quindi, sito-specifici (Grenni et al., 2018; Barra Caracciolo et al., 2019; Finizio et al., 2020).

Pertanto, al fine di adottare un approccio precauzionale per il riutilizzo delle terre e rocce da scavo, i test ecotossicologici devono essere eseguiti per ciascuna litologia e prodotto condizionante utilizzato; tra gli organismi test che si sono mostrati sensibili alla presenza di residui di SLES, l'Ostracode *Heterocypris incongruens* è risultato idoneo vivendo nell'interfaccia acqua-suolo.

1.3 *Heterocypris incongruens*: specie test

La specie *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) appartiene alla classe Ostracoda, famiglia Cyprididae. È un organismo cosmopolita, bentonico di acqua dolce che vive principalmente in pozze d'acqua stagionali (temporanee) e piccoli corpi d'acqua.

H. incongruens è una specie autoctona elencata nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist>). Possiede un guscio calcareo esterno a due valve (Foto 2) che racchiude l'organismo. Questo ostracode può nuotare e stare a diretto contatto con la matrice solida.

Gli individui di questa specie sono onnivori; infatti la loro alimentazione consta principalmente di batteri, alghe, detrito organico, materiale vegetale e invertebrati vivi o morti (Meisch, 2000, Rossi et al., 2011). La specie è tipicamente a strategia r e sono noti fenomeni di cannibalismo, anche come strategia di controllo della densità della popolazione della specie (Rossi et al., 2011, Juárez-Franco et al., 2009).



Foto 2. Immagine di individuo adulto di *H. incongruens* allo stereomicroscopio (ingrandimento 40x). Foto realizzata presso i laboratori IRSA-CNR di Roma-Montelibretti.

Il ciclo vitale dura tra i 47 e i 121 giorni (Meisch, 2000) e la riproduzione avviene principalmente per via partenogenetica con la produzione di uova a sviluppo indiretto di piccoli naupli (150-200 µm). Il raggiungimento dello stadio adulto (femmine: 1,2 - 1,9 mm; maschi: 1,2 - 1,3 mm) avviene in poche settimane, attraverso 8 stadi larvali e diversi stadi giovanili (Smith et al., 2018).

H. incongruens produce due tipologie di uova, deposte in clusters, di cui circa l'85% sono la forma di resistenza quiescente (cisti). Quest'ultima può riprendere la propria attività anche dopo lunghi periodi in assenza di umidità ed esposizioni a temperature comprese tra i -25°C e i 40°C (Angell e Hancock, 1989; De Cooman et al., 2015).

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test con *Heterocypris incongruens* (ISO 14371:2012) è un saggio statico, per contatto diretto di neonati, schiusi da uova quiescenti (cisti). Dopo un tempo di esposizione di 6 giorni vengono valutati due endpoint:

- la mortalità (effetto acuto);
- l'inibizione della crescita (effetto subcronico).

I valori di mortalità vengono espressi come mortalità media (%). L'endpoint subcronico viene espresso come inibizione della crescita (%), valutato rispetto a quanto misurato nel sedimento standard.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo ostracode viene utilizzato in studi ecotossicologici per testare gli effetti di sostanze tossiche pure (EC₅₀, utilizzando il sedimento standard come substrato), di campioni ambientali contaminanti, quali sedimenti di acqua dolce, suoli, ecc. (Chiral e Persoone, 2003; Latif and Licek, 2004; Jensen et al. 2006; Hubálek et al., 2007; Pérez-Sirvent et al., 2010; Baudo et al. 2011; Baudo et al., 2013).

Studi specifici (Baudo, 2010) e l'utilizzo diffuso in Europa di questo ostracode ha portato nel 2012 alla standardizzazione e pubblicazione ufficiale del metodo da parte dell'*International Organization for Standardization* (ISO 14371:2012).

Il test è stato utilizzato in alcuni studi di compatibilità ambientale di terreni derivanti dallo scavo meccanizzato di gallerie mediante EPB-TBM nel quale erano stati utilizzati prodotti schiumogeni contenenti SLES come componente principale.

Nel caso specifico qui riportato il test viene inserito in una batteria di saggi ecotossicologici per valutare la compatibilità ambientale di terre e rocce da scavo trattate con un prodotto schiumogeno. La scelta di utilizzare questo organismo è supportata dal fatto che il crostaceo vive nell'*interfacies* acqua-matrice solida e, conseguentemente, è realmente a diretto contatto con il substrato trattato con i prodotti schiumogeni utilizzati per condizionamento del terreno.

3.1 Vantaggi procedurali del metodo ai fini dell'applicazione specifica

Il test applicato ha diversi vantaggi:

- rapidità della risposta subcronica (tempo di esposizione degli organismi: 6 giorni);
- riproducibilità dei risultati (cicli vitali brevi);
- affidabilità del risultato (per l'utilizzo di un elevato numero di organismi) (Blaise, 1991).

H. incongruens è un organismo bentonico e, di conseguenza, più esposto all'azione dei composti adsorbiti sul terreno e alla tossicità rilasciata dal substrato (Ghetti & McKenzie, 1981), rispetto ad altri Crostacei planctonici e meioplactonici comunemente utilizzati in ecotossicologia.

Inoltre questo test è disponibile in commercio sotto forma di kit (Ostracodtoxkit FTM cronico, MicroBioTest Inc.) in linea con la norma ISO, escludendo la necessità di allevare la specie test in laboratorio.

Infine, nell'applicazione specifica a terre e rocce da scavo, il vantaggio è nell'esporre l'organismo test simultaneamente sia al terreno trattato che alla soluzione standard nella quale i tensioattivi passano in soluzione, essendo sostanze di natura idrofila.

4. APPARECCHIATURE

Le apparecchiature necessarie per eseguire il test sono le seguenti:

- 4.1 Camera termostata (temperatura: 25±1 °C);
- 4.2 Lampada (3000 - 4000 lx) da inserire nella camera termostata;
- 4.3 Aeratore per acquari ;
- 4.4 pH-metro;
- 4.5 Stereo-microscopio (Leica modello 9i) con diversi ingrandimenti (fino a 55x), dotato di telecamera e collegato a PC; software di elaborazione di immagine per la misura della lunghezza degli organismi.

5. REAGENTI E MATERIALI

- 5.1 Organismo test: cisti di *H. incongruens*;
- 5.2 Nutrimento: *Spirulina platensis* (alga blu-verde) per il *pre-feeding*; *Scenedesmus spp.* (alga verde) ;
- 5.3 Acqua artificiale: (Standard Freshwater): NaHCO₃ (96 mg/L); CaSO₄ · 2H₂O (60 mg/L); MgSO₄ · 7 H₂O (60 mg/L); KCl (4 mg/L); l'acqua così preparata deve avere pH 7.4-7.8; durezza 80-100 mg/L CaCO₃; alcalinità 60-70 mg/L CaCO₃;
- 5.4 Tossico di riferimento: CuSO₄ · 5 H₂O;
- 5.5 Acqua deionizzata (conducibilità <10 µS);
- 5.6 Soluzione di Lugol (immobilizzante) contenente: iodio (I₂) e ioduro di potassio (KI); acqua deionizzata;
- 5.7 Capsule Petri in plastica inerte (Ø 5 cm), per la schiusa delle cisti;
- 5.8 Camere test: piastre con 6 pozzetti (Ø 3,5 cm); camere per la lettura, con fondo sottile;
- 5.9 Micropipette in vetro con becco curvo (Ø 1 mm) per il trasferimento degli organismi;

- 5.10 Pipette Pasteur in plastica inerte (volume 3 mL);
- 5.11 Spatola in plastica scavata con capacità di 500 o 1000 μ L per il campionamento della matrice da testare;
- 5.12 Spatola in plastica piatta;
- 5.13 Microsetaccio in plastica (vuoto di maglia: 100 μ m) per la raccolta degli individui test;
- 5.14 Sedimento standard: sabbia di fiume o marina di granulometria 0-2 mm, non di origine calcarea e non intrinsecamente tossica.

6. PROCEDURA

La procedura di allestimento ed esecuzione del test qui descritta è un'applicazione del metodo ISO 14371:2012 (*Water Quality - Determination of fresh water sediment chronic toxicity to *Heterocypris incongruens* - Crustacea, Ostracoda*), con alcuni adattamenti alla matrice terre da scavo.

Il saggio viene condotto utilizzando l'OstracodToxKit F (MicroBioTests Inc., Mariakerke, Belgium) in accordo con le indicazioni riportate nel manuale del kit e la norma ISO.

Il test si esegue esponendo gli organismi direttamente alla matrice ambientale (nel caso specifico qui riportato: terre da scavo, trattata o non trattata con agenti schiumogeni) con il supplemento di acqua artificiale (*Standard Freshwater*, SF). Questa procedura permette di rilevare gli effetti tossici di sostanze ed elementi che sono sia adsorbiti al suolo che potrebbero essere rilasciati anche in acqua, simulando realisticamente le condizioni a cui l'ostracode sarebbe esposto nell'ambiente impattato con i prodotti schiumogeni.

La procedura prevede come bianco di riferimento (controllo negativo) l'utilizzo del sedimento standard con il supplemento di acqua artificiale da preparare secondo le istruzioni del kit. Inoltre, come controllo positivo, è stata utilizzata una soluzione preparata con un tossico di riferimento ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) ad una concentrazione nota di effetto ($\text{LC}_{50} = 5,8 \text{ mg/L}$) aggiunta al sedimento standard.

6.1 Schiusa delle cisti

Gli ostracodi sono forniti sotto forma di uova durature (cisti) e per la loro schiusa viene preparata l'acqua artificiale (SF) con i sali forniti dal kit e acqua distillata (per 1 Litro: 96 mg di NaHCO_3 , 60 mg di $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60 mg di MgSO_4 e 4 mg di KCl). Il pH della SF deve essere intorno a $7,6 \pm 0,3$. Tale soluzione viene areata per 15 minuti prima del suo utilizzo per avere un contenuto di ossigeno disciolto simile al valore di saturazione dell'aria.

Per ottenere gli organismi neonati su cui eseguire il test, le cisti di ostracode vengono poste in una capsula Petri con 8 mL di SF, e messe ad incubare per 48 h a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ in condizioni di illuminazione continua (3000-4000 lux).

Al termine di tale periodo, viene effettuato un *pre-feeding* utilizzando la forma disidratata dell'alga blu-verde, *Spirulina platensis* (1 fiala del kit per ciascuna

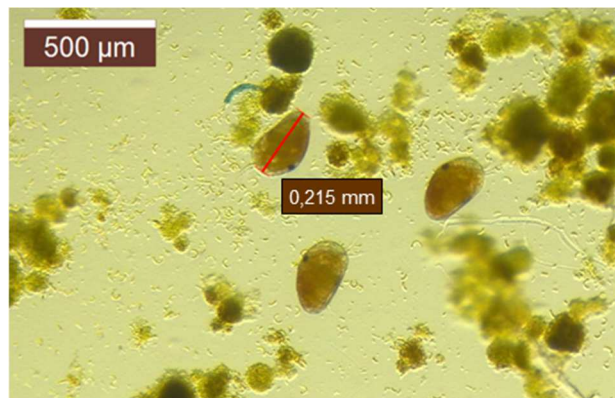


Foto 3. Immagine di neonati di *H. incongruens*; con misura della lunghezza a 52 h dalla schiusa.

piastre); le capsule Petri vengono messe nuovamente ad incubare per altre 4 h nelle medesime condizioni (Foto 3).

6.2 Allestimento del Test

Si allestiscono le camere test (piastre con 6 pozzetti, Foto 4) sia per ciascun campione da analizzare che per i controlli (positivo: sedimento standard con il tossico di riferimento; negativo: sedimento standard e SF). I campioni vengono dunque saggiati in sei repliche.

Ciascun pozzetto viene allestito come segue: 10 neonati di *H. incongruens* (ottenuti come precedentemente descritto), 2 mL di SF, 1.000 μ L di campione (terreno o sedimento di riferimento), 2 mL di sospensione algale di *Scenedesmus* spp. (necessaria al sostentamento degli organismi durante il test).

Le camere test vengono incubate per 6 giorni a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ in condizioni di buio assoluto.

Inoltre, prima dell'esposizione, viene rilevata la lunghezza media iniziale dei 10 neonati, che verrà poi confrontata, al termine dell'esposizione, con quella degli organismi sopravvissuti nei campioni e nel sedimento di riferimento per valutare l'eventuale effetto subcronico.



Foto 4. Allestimento del test. A sinistra: piastre multipozzetto con terreni da analizzare. A destra: Microscopio Leica 9i utilizzato per la misurazione degli organismi.

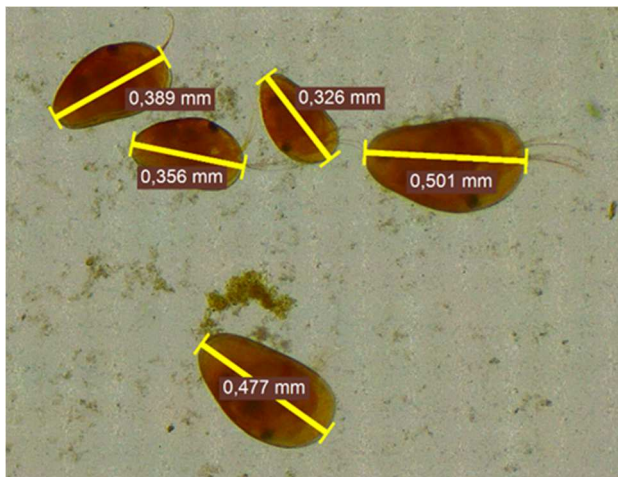


Foto 5. Rilevamento (mediante il Microscopio Leica S9I e software LAS V4.12, Leica) dell'accrescimento degli individui dopo 6 giorni di esposizione ad un campione di terreno. L'effetto di inibizione sulla crescita è rilevabile dalla differente lunghezza di alcuni individui.

Al termine del test, gli organismi sopravvissuti si recuperano (attraverso il microsetaccio) trasferendoli in piastra di lettura dove si immobilizzano con fissativo Lugol (preparato con 5 g I₂ e 10 g di KI con 85 mL di acqua distillata) per procedere alla valutazione dei due *endpoint*:

- acuto, rilevando il numero di individui sopravvissuti; si considerano non vitali gli organismi che, dopo sollecitazione, non presentano alcun movimento, compreso quello delle antenne;
- subcronico, rilevando la lunghezza degli organismi allo stereoscopio (mediante scala graduata 50 µm o il software Leica, Foto 5), misurando l'estensione maggiore di una valva.

6.3 Calcolo ed espressione dei risultati

6.3.1 Effetto acuto

Sulla base del numero di individui vivi nelle repliche del campione e del sedimento standard (controllo negativo), si calcola la mortalità media percentuale, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione (CV%). Infine la mortalità è stata espressa come mortalità di Abbott (al netto della percentuale di mortalità osservata nel sedimento standard) attraverso la seguente formula (Abbott, 1925):

$$\text{Mortalità (\%)}_{\text{Abbott}} = \{(x-y)/x\} * 100$$

dove x = % di vivi nel sedimento standard e y = % di vivi nei campioni testati

6.3.2 Effetto subcronico

Si calcola l'accrescimento medio di tutti i sopravvissuti in ogni replica del campione e del controllo negativo (sedimento standard) dopo i 6 giorni di esposizione. L'accrescimento si calcola secondo la seguente formula:

$$\text{Accrescimento (A)} = L_f - L_i$$

dove L_f è la lunghezza media registrata nei campioni e nel sedimento standard alla fine del saggio; L_i è la

lunghezza media determinata sui 10 ostracodi neonati misurati all'inizio del saggio (lunghezza di circa 200 µm).

L'accrescimento medio nel controllo negativo e nei campioni si ottiene sottraendo la lunghezza media dei neonati, misurata prima dell'esposizione, a quella dei sopravvissuti alla fine del test.

Il valore finale di inibizione di crescita (IG%) di ogni campione viene calcolato nel seguente modo:

$$\text{IG\%} = 100 - (A_{\text{campione}} / A_{\text{controllo}}) * 100$$

in cui A_{campione} è l'accrescimento medio del campione e A_{controllo} quello riferito al controllo negativo.

6.4 Criteri di Validità e soglia di tossicità

Secondo quanto riportato nella procedura ISO, la mortalità percentuale nel controllo negativo deve essere < 20% e l'incremento della crescita deve essere almeno di 1.5 volte rispetto alla lunghezza registrata all'inizio del test. Inoltre, per calcolare l'effetto subcronico su ogni campione, la mortalità deve essere < 30%; infatti l'accrescimento deve essere eseguito su un numero di organismi sufficientemente rappresentativo.

I risultati di ciascun campione vengono considerati validi se il coefficiente di variazione tra le repliche (CV%) è compreso tra il 20 ed il 30% (Environment Canada, 1990). Il CV% viene calcolato nel modo seguente:

$$\text{CV\%} = (\text{Dev. st.} / \text{media}) * 100$$

dove media e la deviazione standard (Dev. st.) si riferiscono ai valori delle repliche del campione per ciascun *endpoint* (mortalità e crescita).

I risultati sono considerati di effetto se gli *endpoint* superano la soglia di tossicità con valori > 20% (Persoone et al., 2003; De Cooman et al., 2015).

6.5 Analisi dei dati

Per determinare i valori di EC₅₀, il metodo ISO indica il l'uso del software US EPA Benchmark Dose (BMD5). Allo stesso scopo, il Software REGTOX 7.0.3 (http://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.htm) viene consigliato da MicroBioTest e da diversi autori (Toumi et al., 2015; Hoss et al., 2010; Casado-Martinez et al., 2016), sebbene non sia un software convalidato.

I dati dell'effetto subcronico possono essere analizzati attraverso l'analisi della varianza ad una via (test di Dunnett; Toumi et al., 2015).

7. INTERFERENZE

Le caratteristiche chimiche, fisiche, mineralogiche e granulometriche del campione da testare possono influenzare il risultato finale del test. Per esempio, data la natura calcarea del guscio di *H. incongruens*, non sono raccomandati valori di pH acidi durante l'esecuzione del test. Inoltre, la composizione del campione da testare (in particolare la presenza di argille tipo Kaolinite) può inficiare l'accrescimento di

H. incongruens (Casado-Martinez et al., 2016). L'inibizione dell'accrescimento in presenza di particelle fini può essere dovuta al fatto che gli ostracodi ingeriscono le particelle di argilla al posto della fonte primaria di cibo (alghe), che potrebbe determinare una inibizione della crescita in proporzione al contenuto della frazione fine del campione.

Le caratteristiche del campione in analisi devono essere quindi considerate per una corretta interpretazione del risultato, attribuendo la tossicità unicamente alla presenza degli xenobiotici (Casado-Martinez et al., 2016). Pertanto la valutazione dell'eventuale interferenza della matrice viene effettuata considerando la risposta degli organismi al terreno non trattato (controllo della matrice testata).

8. ESEMPIO DI APPLICAZIONE DEL TEST AD UN CASO REALE: TERRE E ROCCE DA SCAVO

Di seguito viene riportato, a titolo esemplificativo, una sperimentazione eseguita presso l'IRSA-CNR per valutare la compatibilità ambientale di campioni di terreno provenienti da uno scavo per la realizzazione di una galleria (profondità terreno 15-30 m) tramite l'utilizzo di una fresa meccanica. Il terreno era stato trattato con un prodotto schiumogeno (P1), comunemente utilizzato nelle attività di scavo, contenente il tensioattivo anionico SLES come componente principale. La sperimentazione ha previsto l'allestimento di microcosmi in laboratorio con il terreno trattato, al fine di simulare le condizioni di permanenza in cantiere dei terreni scavati (la stesa a terra e il deposito temporaneo in vasche di cemento). A diversi tempi sperimentali, sono state campionate aliquote di terreno sulle quali sono state eseguite sia le analisi della concentrazione del tensioattivo SLES (Rauseo et al. 2017), che l'esecuzione di alcuni test ecotossicologici. La valutazione ecotossicologica è stata eseguita utilizzando una batteria di test comprensiva di organismi afferenti a vari livelli trofici: *Vibrio fischeri* (UNI EN ISO 11348-3:2019) e *Lepidium sativum* (UNICHIM N. 1651: 2003) sull'estratto acquoso (elutriato) dei terreni; *Heterocypris incongruens* (ISO 14371:2012) sulla matrice terreno. I risultati ecotossicologici qui riportati si riferiscono alla risposta di *H. incongruens*.

8.1 Allestimento sperimentazione in microcosmi

Campioni di terre e rocce da scavo (3 repliche per ogni condizione: terreni di controllo, non condizionati, e terreni condizionati) sono stati posti in microcosmi di laboratorio (Beckers, volume 1L; Foto 6) e mantenuti a temperatura costante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) per l'intera durata dell'esperimento (14 giorni). A tempi prefissati (0, 7, 14 giorni) sono state campionate aliquote di terreno per valutarne l'eventuale tossicità iniziale e/o una sua diminuzione al degradare del tensioattivo presente nel terreno.

Le concentrazioni di SLES presenti nel prodotto P1 e la quantità di quest'ultimo utilizzato per m^3 di terreno (espresso come TR, L/m^3 , vedi par. 1.2), sono riportati in Tabella 1.

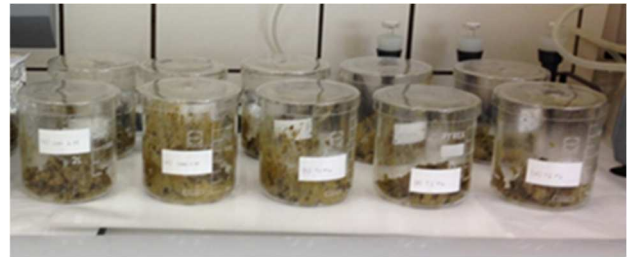


Foto 6. Microcosmi contenenti il terreno di scavo condizionato con lo schiumogeno P1.

Tabella 1. Principali caratteristiche del prodotto schiumogeno P1: concentrazione (%) e N.ro CAS del suo componente principale, Sodio Lauril Etere Solfato (SLES); Treatment Ratio (TR).

Prodotto	SLES %	N.ro CAS SLES	TR L/m^3
P1	5-10	9004-82-4	1.26

8.2 Risultati

La concentrazione di tensioattivo anionico SLES è diminuita nel tempo, confermando la sua biodegradabilità, secondo quanto riportato anche in altri studi (Barra Caracciolo et al., 2019).

I risultati ecotossicologici relativi al saggio eseguito con *H. incongruens* sono riportati nella Figura 1 e 2, rispettivamente per l'effetto acuto (mortalità di Abbott), e quello subcronico (inibizione della crescita). Nell'insieme si rileva che all'inizio della sperimentazione ($t=0$) il terreno trattato con lo schiumogeno ha avuto un leggero effetto acuto (mortalità, Fig. 1), che non è stato più registrato ai tempi successivi. Per quanto riguarda l'effetto subcronico (inibizione della crescita, Fig. 2), l'ostracode ha risposto alla presenza del prodotto schiumogeno ai tempi 7 e 14 giorni. E' stato, dunque, registrato un valore medio di inibizione della crescita $>20\%$, sebbene a 14 giorni tale valore relativo al terreno trattato era comparabile a quello del terreno di controllo non trattato. Tale risposta equivalente al controllo negativo, è dunque non impu-

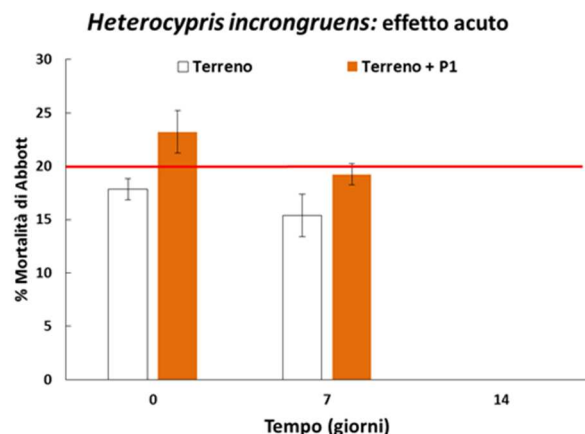


Figura 1. Effetto acuto espresso come Mortalità di Abbott (%) del Terreno trattato con l'agente schiumogeno P1 (Terreno + P1) e non trattato (Terreno) ai tempi di campionamento della sperimentazione, con relativi errori standard.

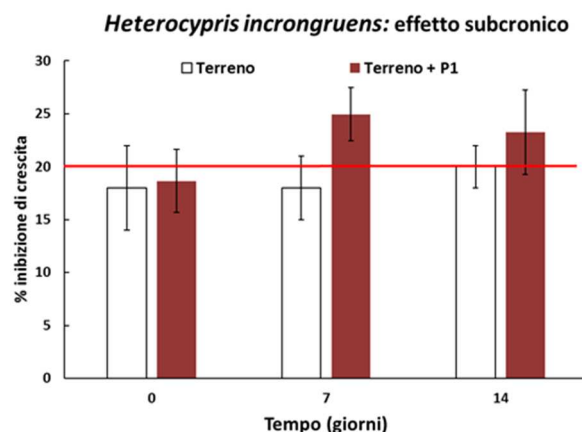


Figura 2. Effetto sub-cronico espresso come inibizione della crescita (%) del Terreno trattato con l'agente schiumogeno P1 (Terreno + P1) e non trattato (Terreno) ai tempi di campionamento della sperimentazione, con relativi errori standard.

tabile alla presenza del prodotto schiumogeno

CONCLUSIONI

La possibilità di riutilizzare le terre e rocce provenienti dallo scavo di gallerie con fresa meccanica è un'importante opportunità per evitare la produzione di enormi quantità di rifiuti. Inoltre elude i costi economici di trasporto e smaltimento, e la collocazione in discarica con occupazione di suolo e sottrazione di tale preziosa risorsa e dei suoi servizi ecosistemici. Pertanto, l'utilizzo dei terreni come sottoprodotto risponde ai criteri di sostenibilità ambientale.

La scelta dei test ecotossicologici per la valutazione ecocompatibilità ambientale delle terre e rocce viene effettuata in base alla destinazione di uso (industriale o verde pubblico) dei terreni scavati e se il loro deposito definitivo avrà o meno un possibile contatto con corpi idrici.

Il saggio con *H. incongruens*, qui descritto ed applicato a terre e rocce da scavo, ha il vantaggio di fornire contemporaneamente indicazioni sia sulla tossicità acuta che sub-cronica, fornendo indicazioni complementari per la valutazione degli effetti a medio termine degli agenti schiumogeni. Inoltre l'organismo testato, venendo a contatto diretto con la matrice solido-liquida testata, risponde a possibili concentrazioni residuali del contaminante in entrambi i comparti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il dott. Davide Balducci che ha contribuito all'applicazione del test sulla matrice specifica, terre e rocce, durante il suo periodo di tirocinio di tesi sperimentale presso l'IRSA-CNR di Roma, e la dott.ssa Ilaria Mazzini dell'IGAG-CNR, per il supporto tecnico-scientifico conoscitivo sulla specie test.

BIBLIOGRAFIA

ABBOTT W.S., (1925): "A method for computing effectiveness of an insecticide". *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267

ANGELL, R.W., HANCOCK, J.W., (1989): "Response of Eggs of *Heterocypris Incongruens* (Ostracoda) to Experimental Stress". *Journal of Crustacean Biology*, 9 (3): 381-386.

BACCI, E., MARCHETTI, R., (2008): "Misura della tossicità". In: *Ecologia applicata*, a cura di Provini A., Galassi S., Marchetti R., Città Studi Edizioni, Novara: 6: 805-834.

BARRA CARACCILO, A., CARDONI, M., PESCATORE, T., PATROLECCO, L. (2017): "Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunneling". *Environmental Pollution*, 226: 94-103.

BARRA CARACCILO, A., ADEMOLLO, N., CARDONI, M., DI GIULIO, A., GRENNI, P., PESCATORE, T., RAUSEO, J., PATROLECCO, L. (2019): Assessment of biodegradation of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate used in two foaming agents for mechanized tunnelling excavation. *Journal of Hazardous Materials*, 365: 538-545.

BAUDO, R., FAIMALI, M., ONORATI, F., PELLEGRINI, D., (2011): "Batteria di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre". ISPRA, Manuali e Linee Guida - Serie I Manuali di Ecotossicologia, 67/2011, 10-116.

BAUDO R., (2011): "Risultati di due interconfronti internazionali sui saggi di tossicità acuta con *Thamnocephalus platyurus* e di tossicità subcronica con *Heterocypris incongruens*". In D. PELLEGRINI, I. BUTTINO, M. SECCI, S. MACCHIA, L. DENTONE (a cura di): *Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici in ambienti acquatici*, Atti Giornate di studio 4^a Edizione, Livorno 20-22 ottobre 2010. ISPRA, Serie Atti 2011, pp. 12-15. <http://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/atti/copertina-indice-atti-ecotossicologia.pdf>

BAUDO R., FAIMALI M., ONORATI F., PELLEGRINI D., MUGNAI C., (2013): "Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne". Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Manuali e Linee Guida 88/2013, 79 pp. http://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/MLG_88_2013.pdf

BELLOPEDE, R., BRUSCO, F., ORESTE, M., PEPINO,

P., (2011): "Main aspects of tunnel muck recycling". American Journal of Environmental Sciences, 7: 338-347.

BLAISE C., (1991): "Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility and prospects". Environmental Toxicology and Water Quality, 6: 145-155.

CASADO-MARTINEZ, M.C., BURGA-PÉREZ, K.F., BEBON, R., FÉRARD, J.-F., VERMEIRSEN, E.L.M., WERNER, I., (2016): "The sediment-contact test using the ostracod *Heterocypris incongruens*: Effect of fine sediment and determination of toxicity thresholds". Chemosphere, 151: 220-224.

CHAPMAN P.M., (2002): "Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology". Marine Pollution Bulletin, 44: 7-15.

CHIAL B, PERSOONE G. (2003): "Cyst-based toxicity tests XV—application of ostracod solid-phase microbiotest for toxicity monitoring of contaminated soils". Environmental Toxicology, 18: 347-352.

DE COOMAN, W., BLAISE, C., JANSSEN, C., DETEMMERMAN, L., ELST, R., PERSOONE, G., (2015): "History and sensitivity comparison of two standard whole-sediment toxicity tests with crustaceans: the amphipod *Hyaella Azteca* and the ostracod *Heterocypris incongruens* microbiotest. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 416: 15

D.M. 161/2012 Decreto del Ministero dell'Ambiente e della tutela del Territorio e del Mare 10 agosto 2012, n. 161 Regolamento recante la disciplina dell'utilizzazione delle terre e rocce da scavo (G.U. n. 221 del 21 settembre 2012)

D.P.R. 120/2017 DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA 13 giugno 2017, n. 120- Regolamento recante la disciplina semplificata della gestione delle terre e rocce da scavo, ai sensi dell'articolo 8 del decreto-legge 12 settembre 2014, n. 133, convertito, con modificazioni, dalla legge 11 novembre 2014, n. 164 (G.U. n. 183 del 7 agosto 2017)

EFNARC (2005): "Specification and Guidelines for the use of specialist products for Mechanized Tunnelling (TBM) in Soft Ground and Hard Rock. EFNARC, Association House, 99 West Street, Farnham, Surrey GU9 7EN, UK. Available at <http://www.efnarc.org/pdf/TBMGuidelinesApril05.pdf>

EFSA Scientific Committee, 2019. Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5634>

ENVIRONMENT CANADA, (1990): "Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants" / Prepared by Gary Sergy, Technology Development Branch. Environmental Protection Series EPS 1/RM/12. Environment Canada, Ottawa, 85 pp.

FINIZIO, A, PATROLECCO, L, GRENNI, P, PATROLECCO, L., GRENNI, P., GALLI, E., MUZZINI V.G., RAUSEO, J., RIZZI, C., BARRA CARACCILO, A., (2020): "Environmental risk assessment of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate in site-specific conditions arising from mechanized tunnelling". Journal of Hazardous Materials, 383: 121116.

GHETTI P.F., MCKENZIE K.G., (1981): "Crustacea, Ostracoda. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane" C.N.R., Roma, pp. 83.

GRENNI, P., BARRA CARACCILO, A., PATROLECCO, L., ADEMOLLO, N., RAUSEO, J., SACCÀ, M.L., MINGAZZINI, M., PALUMBO, M.T., GALLI, E., MUZZINI, V., POLCARO, C.M., DONATI, E., LACCHETTI, I., DI GIULIO, A., GUCCI, P., BECCALONI, E., MININNI, G. (2018): "A bioassay battery for the ecotoxicity assessment of soils conditioned with two different commercial foaming products". Ecotoxicology & Environmental Safety, 148: 1067-1077.

GRENNI, P., BARRA CARACCILO, A., PATROLECCO, L., (2019): "Site-specific protocols for evaluating environmental compatibility of spoil materials produced by EPB-TBMs". In book: Tunnels and Underground Cities: Engineering and Innovation meet Archaeology, Architecture and Art. Proceedings of the WTC 2019 ITA-AITES World Tunnel Congress (WTC 2019), May 3-9, 2019, Naples, Italy Publisher: Taylor and Francis Group

HÖSS, S., AHLF, W., FAHNENSTICH, C., GILBERG, D., HOLLERT, H., MELBYE, K., MELLER, M., HAMMERSWIRTZ, M., HEININGER, P., NEUMANN-HENSEL, H., OTTERMANN, R., RATTE, H.T., SEILER, T.B., SPIRA, D., WEBER, J., FEILER, U. (2010): Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination—determination of toxicity thresholds. Environmental Pollution 158(9): 2999-3010.

HUBÁLEK, T., VOSÁHLOVÁ, S., MATEJŮ, V., KOVÁCOVÁ, N., NOVOTNÝ, C., (2007): "Ecotoxicity Monitoring of Hydrocarbon-Contaminated Soil During Bioremediation: A Case Study". Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 52 (1): 1-7.

ISO, (2012). Water Quality - Determination of fresh water sediment chronic toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). ISO 14371:2012, 17

pp.

JUÁREZ-FRANCO M.F., SARMA S.S.S., NANDINI S., (2009): "Population dynamics of *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) (Ostracoda, Cyprididae) in relation to diet type (algae and organic waste) and amount of food". *Crustaceana*, 82 (6): 743-752.

JENSEN, J., SOROKIN, N., DIRVEN-VAN BREEMEN, E.M., BOGOLTE, T., ERLACHER, E., EHLERS, C., TER LAAK, T., HARTNIK, T., BIERKENS, J., RUTGERS, M., MESMAN, M. (2006): "A triad-based selection of tools for site-specific assessment of ecological risk". In: *Ecological Risk Assessment of Contaminated Land. Decision support for site specific investigations*. [RIVM Report 711701047, The Netherlands and Denmark] pp. 65-116. <http://dce.au.dk/fileadmin/Attachments/Chapter6.pdf>

MEISCH, C., (2000): "Freshwater Ostracoda of Western and Central Europe". Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 522 pp.

Metodo UNICHIM N. 1651: 2003 (Qualità dell'acqua – Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo).

LATIF, M., LICEK, E., (2004): "Toxicity assessment of wastewaters, river waters, and sediments in Austria using cost-effective microbioassays". *Environmental Toxicology*, 19(4): 302-9

MEISCH C., (2000): "Freshwater Ostracoda of Western and Central Europe". Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin: 522 pp.

OECD, (2018). Considerations for Assessing the Risks of Combined Exposure to Multiple Chemicals, Series on Testing and Assessment No. 296, Environment, Health and Safety Division, Environment Directorate. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>

MININNI, G., SCIOTTI, A., MARTELLI, F. (2018): "Characterization and management of excavated soil and rock". In: SETAC Europe (ed) SETAC Europe 28th Annual Meeting, Responsible and Innovative Research for Environmental Quality. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe (SETAC Europe) ABSTRACT BOOK. P. 96. https://rome.setac.org/wp-content/uploads/2018/04/abstract-book_scientific-part_FINAL-cover-3.pdf

ORESTE, P., CASTELLANO, M., (2012): "An applied study on the debris recycling in tunnelling". *American Journal of Environmental Sciences*, 8(2): 179-184.

PADULOSI, S., MARTELLI, F., SCIOTTI, A., PUTZU D.F., FILIPPONE M., (2019): "Environmental risk assessment of conditioned soil: some Italian case studies". In: Peila D, Viggiani G, Celestino T (eds.) *Tunnels and Underground Cities. Engineering and Innovation Meet Archaeology, Architecture and Art: Proceedings of the WTC 2019 ITA-AITES World Tunnel Congress (WTC 2019)*. CRC Press, pp 505-514

PEILA D., (2014). Soil Conditioning for EPB Shield Tunnelling. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 18 (3): 831-836.

PÉREZ-SIRVENT, C., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M.J., MOLINA, J. GARCÍA-LORENZO M.L., (2010): "Toxicity of sediments and their leachates in samples from Portman bay (SE, Spain)". *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (2): 137-146.

PERSOONE, G., MARSALEK, B., BLINOVA, I., TOROKNE, A., ZARINA, D., MANUSADZIANAS L., NAŁĘCZ-JAWECKI G., TOFAN L., STEPANOVA N., TOTHOVA L., KOLAR, B. (2003): "A practical and user-friendly toxicity classification system with microbioassays for natural waters and wastewaters". *Environmental Toxicology*, 18: 395-402.

RAUSEO, J., ADEMOLLO N., PESCATORE T., PATROLECCO L., (2017): "Determinazione di tensioattivi anionici in terreni provenienti dallo scavo in sotterraneo mediante Estrazione Liquida Pressurizzata (PLE) e metodo MBAS (Sostanze Attive al Blu di Metilene) modificato. Notiziario dei Metodi Analitici 1: 15-22. <http://www.irs.cnr.it/index.php/en/prodotti-della-ricerca/notiziario>

ROSSI, V., BENASSI, G., BELLETTI, F., MENOZZI, P., (2011): "Colonization, population dynamics, predatory behaviour and cannibalism in *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda)". *Journal of Limnology*, 70 (1): 102-108

SCHER, SCCS, SCENIHR, 2012. Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), and the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Toxicity and assessment of chemical mixtures. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf

SMITH R.J., ZHAI, D., SAVATENALINTON, S., KAMIYA, T., YU N., (2018): "A review of rice field ostracods (Crustacea) with a checklist of species". *Journal of Limnology*, 77 (1): 1-16.

TOKGÖZ, N. (2013): "Use of TBM excavated materials as rock filling materials in an abandoned quarry pit designed for water storage". *Engineering Geology*,

153: 152-162.

TOUMI, H., BURGA-PEREZ, K.F., FERARD, J.-F. (2016): "Acute and chronic ecotoxicity of carbaryl with a battery of aquatic bioassays". *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(1): 57-62.

UNI EN ISO 11348-3:2019 Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti) - Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati

VINAI R., OGGERI C., PEILA D. (2008): "Soil conditioning of sand for EPB applications: A laboratory research". *Tunnelling and Underground Space Technology*, 23 (3): 308-317 .

Messa a punto di una metodica analitica in HPLC-MS/MS e relativi metodi di estrazione per la determinazione di miscele di antibiotici in matrici complesse

a cura di

Francesca Spataro¹, Jasmin Rauso (1.*), Nicoletta Ademollo¹, Tanita Pescatore^{1,2}, Luisa Patrolecco¹

¹ Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Scienze Polari (ISP-CNR), Roma.

² Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche (DEB), Viterbo.

RIASSUNTO

Nel presente contributo viene descritto un metodo per la determinazione di due classi di antibiotici, fluorochinoloni e sulfonamidi, sia da matrici solide (suolo, digestato) che liquide (acqua fluviale). Per quanto riguarda le matrici solide, il metodo ha previsto una fase di estrazione liquida pressurizzata (PLE) degli analiti e successiva purificazione tramite estrazione in fase solida (SPE). Per la matrice liquida, l'estrazione e la purificazione degli estratti è avvenuta contestualmente mediante SPE. La determinazione analitica degli antibiotici è stata eseguita tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa a triplo quadrupolo (MS/MS). La quantificazione è stata eseguita mediante diluizione isotopica con standard di riferimento marcati con isotopi stabili.

SUMMARY

This work reports a method for determining two classes of antibiotics, fluoroquinolones and sulfonamides, both from solid (soil, digestate) and liquid (river water) matrices. In solid matrix (soil, digestate), this method involved a pressurized solvent extraction (PLE) of analytes and the subsequent purification step by solid phase extraction (SPE). The liquid matrix (river water) was extracted/purified directly by SPE. The analytical determination of antibiotics was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a triple quadrupole mass spectrometry detector (MS/MS). Quantification was achieved by isotopic dilution with standards labelled with stable isotopes.

1. INTRODUZIONE

Gli antibiotici sono molecole attive a bassissime concentrazioni, sintetizzate per produrre effetti biologici diretti verso specifici bersagli presenti negli organismi che li assumono. Fanno parte della categoria dei contaminanti organici definiti "emergenti" (Direttiva 2013/39/EC), in quanto non ancora normati a livello europeo e si ritrovano in modo ubiquitario a concentrazioni in traccia sia nell'ambiente acquatico che terrestre. Una volta assunti, questi composti possono essere metabolizzati completamente o parzialmente, con conseguente formazione di intermedi spesso ancora attivi. La maggior parte dell'antibiotico assunto viene generalmente escreta inalterata dall'organismo (Loos et al., 2013) e, attraverso le vie fognarie, concentrazioni residuali di antibiotico e dei suoi metaboliti raggiungono gli impianti di depurazione delle acque reflue. Molti degli impianti di trattamento tradizionali presenti sul territorio nazionale non sono in grado di eliminare completamente composti di questo tipo, causandone dunque l'ingresso nelle acque superficiali (Patrolecco et al., 2014, Spataro et al., 2019). Un'ulteriore via di immissione degli antibiotici nell'ambiente deriva dal loro uso in campo veterinario negli allevamenti zootecnici, in quanto possono raggiungere direttamente il terreno tramite le escrezioni animali

o indirettamente in seguito all'immissione nei terreni agricoli di ammendanti organici contenenti antibiotici (ad es. letame, fanghi derivanti dagli impianti di depurazione delle acque, compost). Il dilavamento di tali terreni concimati può inoltre portare ad una contaminazione delle acque superficiali o di falda. Altre vie di ingresso nell'ambiente possono essere costituite dallo smaltimento improprio di farmaci o da scarichi diretti di ospedali o industrie farmaceutiche. I rischi dovuti alla presenza di antibiotici nell'ambiente, seppur in concentrazioni residuali, sono in gran parte associati a effetti diretti su popolazioni microbiche naturali coinvolte in importanti funzioni ecosistemiche (Grenni et al., 2018; Rajesh Kumar et al., 2012). Desta sempre più preoccupazione la problematica relativa alla diffusione di ceppi batterici resistenti agli antibiotici e alla trasmissione dei relativi geni che conferiscono tale resistenza. Tale problematica è stata recentemente identificata dalla World Health Organization (WHO) come una delle principali minacce alla salute umana per il prossimo secolo. Tuttavia, l'immissione in ambiente di questi geni e la diffusione dei batteri resistenti agli antibiotici attraverso i reflui urbani, industriali e di allevamenti zootecnici non è ancora considerata dalla legislazione per la salvaguardia ambientale (Grenni et al., 2018). Particolare interesse è attualmente rivolto verso due antibiotici frequentemente riscontrati sia nelle acque che nei suoli,

* rauseo@irsa.cnr.it

quali il sulfametossazolo (SMX) e l'enrofloxacin (ENR). Il primo è un antibiotico ad ampio spettro appartenente alla classe dei sulfonamidi, tra i più prescritti e consumati sia nella medicina umana che in ambito veterinario. La sua azione antibatterica è dovuta all'inibizione dell'enzima diidro-pterato sintetasi, coinvolto nella biosintesi dell'acido folico. Poiché i folati sono intermedi essenziali nella sintesi di alcune basi del DNA nei batteri, questa inibizione è fortemente batteriostatica e alla fine battericida. L'ampio utilizzo di SMX implica la sua presenza in diverse matrici ambientali quali fiumi, acque di falda, acque potabili, suolo etc. Nei principali fiumi europei il SMX è stato riscontrato con una frequenza media del 75% e con una concentrazione media di 76 ng/L (Loos et al., 2008 e 2013). Il SMX è presente in molti residui organici (es. fanghi di depurazione, letame, digestato da impianti a biogas etc.) utilizzati come ammendanti per fertilizzare i terreni agricoli, in concentrazioni fino a 36 mg/kg (Rauseo et al., 2019). La determinazione del suo principale prodotto di trasformazione, N4-acetil-sulfametossazolo (N4-SMX), è di fondamentale importanza per una corretta analisi di rischio ambientale. Infatti, N4-SMX può essere facilmente deacetilato nell'ambiente e quindi ritrasformato nel composto parentale SMX. Ad oggi, tuttavia, sono disponibili solo pochi dati sulla presenza di tale composto nelle diverse matrici ambientali.

La Enrofloxacin (ENR) è un agente chemioterapico sintetico destinato esclusivamente ad uso veterinario, appartenente alla classe dei derivati degli acidi carbossilici fluorochinoloni. La sua attività battericida inibisce la DNA girasi dei batteri Gram-negativi e la topoisomerasi IV dei batteri Gram-positivi. Questi enzimi sono fondamentali per la cellula batterica essendo coinvolti nei processi di duplicazione, trascrizione e riparazione del DNA, dunque il blocco di entrambi i meccanismi porta, in ultima analisi, alla morte del batterio (https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140228127398/anx_127398_it.pdf).

La ENR e il suo metabolita principale, la ciprofloxacina (CIP), sono considerati recalcitranti all'idrolisi e alla biodegradazione e dunque potenzialmente riscontrabili nell'ambiente. La CIP è classificata come antibiotico di importanza critica per l'impiego nella medicina umana ed è stato recentemente incluso nell'elenco di controllo della Watch List 2018/840 (<https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/updated-surface-water-watch-list-adopted-commission>).

La ENR e la CIP sono state rilevate nelle acque superficiali a concentrazioni comprese negli intervalli 67,0-102,5 ng/L e 79,6-119,2 ng/L, rispettivamente (Pena et al., 2007). I due antibiotici sono stati inoltre riscontrati nel letame di bestiame e nel suolo a concentrazioni fino a 1,4 µg/kg per la ENR e 45 µg/kg per la CIP (Cycon et al., 2019).

2. PRINCIPIO DEL METODO

E' stato messo a punto un metodo per l'estrazione quantitativa di due classi di antibiotici (sulfonamidi e fluorochinoloni) sia da matrici solide (terreno e dige-

stato) che da matrici liquide (acque fluviali). L'estrazione da matrice solida è stata realizzata utilizzando la tecnica di estrazione liquida pressurizzata con solventi (PLE), un sistema automatizzato per l'estrazione di una vasta gamma di composti organici da matrici solide di diversa natura dove è possibile variare parametri quali pressione e temperatura di esercizio per aumentare l'efficienza del processo. Il vantaggio della tecnica PLE risiede nella minimizzazione delle possibili interferenze; richiede, inoltre, l'utilizzo di una minore quantità di solventi spesso costosi e tossici e riduce notevolmente i tempi di analisi rispetto ad altri metodi estrattivi (es. Soxhlet).

L'estrazione da matrice liquida degli antibiotici e la purificazione degli estratti da matrice solida ottenuti mediante PLE, sono state realizzate tramite estrazione in fase solida (SPE), che consente di arricchire analiti specifici senza concentrare le specie interferenti. La quantificazione dei contaminanti di interesse è stata realizzata tramite analisi cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa a triplo quadrupolo (HPLC-MS/MS).

3. APPARECCHIATURE

- 3.1 Sistema di estrazione PLE: Accelerated Solvent Extraction- Dionex ASE 150, Thermo Scientific;
- 3.2 Celle di estrazione ASE in acciaio inossidabile, volume 10 mL;
- 3.3 Filtri di cellulosa per celle di estrazione ASE da 1-22 mL ;
- 3.4 Cartucce Oasis HLB (200 mg, 6 mL SPE Tubes), Waters (Massachusetts, USA);
- 3.5 Sistema di estrazione SPE munito di 12 porte (SPELCO Bellefonte, PSA, USA);
- 3.6 HPLC-MS/MS;
 - 3.6.1 Il sistema cromatografico è costituito da un fornello per la Colonna cromatografica mod. LC-100 e una micro pompa HPLC, Series 200 (Perkin Elmer, USA) avente una valvola di iniezione (7125 Rheodyne) con un loop da 20 µL.
 - 3.6.2 Spettrometro di massa a triplo quadrupolo connesso con un detector ESI (electrospray ionization) operante in modalità positiva (+) (MS/MS, mod. API 3000, AB Sciex, Germany).
- 3.7 Colonna cromatografica a fase inversa C18 (Gemini 150×4.6 mm, 5 µm, Phenomenex, France), con annessa precolonna;
- 3.8 Bilancia analitica (Mettler Toledo, modello XPE105) ;
- 3.9 Generatore di acqua ultrapura (qualità 18 MΩ/cm) mediante sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, 137 MA, USA);

4. REAGENTI

Al fine di evitare potenziali fonti di errore ed interferenza, tutti i solventi utilizzati erano di purezza HPLC (HPLC grade). Di seguito sono elencati tutti i reattivi utilizzati per la messa a punto del metodo descritto nel presente contributo:

- 4.1 Sulfametossazolo purezza 99%, (Sigma-Aldrich);
- 4.2 Sulfametossazolo deuterato purezza 99%, (sulfametossazolo-d₄; Sigma-Aldrich);
- 4.3 N₄-acetil-sulfametossazolo purezza 99% (Sigma-Aldrich);
- 4.4 Enrofloxacin purezza 99% (Sigma-Aldrich);
- 4.5 Ofloxacin deuterata purezza 99%, (ofloxacin-d₃, Sigma-Aldrich);
- 4.6 Ciprofloxacin purezza 100% (Sigma-Aldrich);
- 4.7 Metanolo HPLC grade (Carlo Erba);
- 4.8 Acido Formico (Carlo Erba);
- 4.9 Soluzione 0,1% di acido formico in metanolo (Fase mobile A);
- 4.10 Soluzione 0,1% di acido formico in acqua ultrapura (Fase mobile B);
- 4.11 Acetonitrile HPLC grade (Carlo Erba) (Fase mobile C);
- 4.12 Terra di diatomee, (Thermo Scientific);
- 4.13 Acido acetico glaciale (Sigma-Aldrich);

5. ESTRAZIONE DEGLI ANTIBIOTICI DA MATRICE SOLIDA

Per l'estrazione dei campioni solidi è stato utilizzato il metodo PLE riportato in Raueo et al., 2019 modificando il solvente di estrazione. Circa 3 grammi di campione tal quale sono stati omogeneizzati in mortaio d'agata con del materiale inerte (4.12). Le celle di estrazione ASE (3.2) sono state preparate ponendo un filtro di cellulosa (3.3) in corrispondenza della sezione di uscita del solvente di estrazione. Le condizioni operative impostate erano:

- Solvente di estrazione: miscela metanolo: acqua ultrapura (3.9) 1:2, v/v.
- Temperatura di esercizio: 100 °C
- Tempo statico: 5 minuti
- Tempo di riscaldamento: 5 minuti
- Cicli di estrazione: 3
- Volume di lavaggio: 100% del volume della cella di estrazione
- Flussaggio con azoto gassoso (N₂): 150 psi per 60 secondi.

Gli estratti (circa 25 mL) sono stati poi diluiti con acqua ultrapura (3.9) per ottenere un volume finale di 500 mL, e successivamente processati seguendo il metodo SPE riportato nella sezione 6.

6. ESTRAZIONE DEGLI ANTIBIOTICI DA MATRICE LIQUIDA E PURIFICAZIONE DEGLI ESTRATTI

Per l'estrazione degli analiti da acqua fluviale e per la purificazione degli estratti dai campioni solidi ottenuti mediante PLE, è stato seguito il metodo SPE (solid phase extraction) riportato in Spataro et al., 2019. L'SPE è stata effettuata utilizzando cartucce (3.4) impaccate con un materiale adsorbente in fase inversa a bilancio idrofilo-lipofilo (HLB) per acidi, basi e neutri, installate su un sistema Supelco collegato ad un sistema di

vuoto (3.5).

Circa 1 L di acqua fluviale o 500 mL di estratto PLE da matrice solida (sezione 5) viene fatto fluire attraverso la cartuccia SPE (3.4) precedentemente attivata utilizzando sequenzialmente 5 mL di metanolo e 5 mL di acqua ultrapura. Dopo il passaggio del campione, le cartucce SPE sono state essiccate per circa 40 minuti. Infine, gli analiti di interesse sono stati eluiti utilizzando 5 mL di una miscela acetonitrile: metanolo: acido acetico 40:40:20 (v/v/v). Gli eluati sono stati quindi evaporati con un leggero flusso di azoto e i residui sono stati ricostituiti con 0,5 mL di fase mobile (soluzione trifasica costituita da Fase A (4.9), Fase B (4.10) e Fase C (4.11) 70:20:10 (v/v/v)).

7. ANALISI CROMATOGRAFICA

La determinazione degli antibiotici di interesse negli estratti, precedentemente purificati come descritto nelle sezioni 5 e 6 è stata eseguita mediante cromatografia liquida (HPLC, 3.6.1). Nella Tabella 1 sono riportate le condizioni operative dello strumento. L'eluizione a gradiente è stata eseguita ad un flusso di 0,3 mL/min con una fase mobile costituita da: metanolo acidificato con lo 0,1% di Acido Formico (Fase A, 4.9); acqua ultrapura acidificata con 0,1% di Acido Formico (Fase B, 4.10) e acetonitrile (Fase C, 4.11). Il gradiente di eluizione consisteva in 10 min di Fase A: B: C 20:20:60 (v/v/v), seguiti da 5 min di Fase A: B: C 70:20:10 (v/v/v) ed infine 5 min di fase mobile che ritornava alle condizioni iniziali e mantenuta tale per ulteriori 5 min.

Tabella 1. Condizioni operative HPLC.

Pompa analitica	Micro-pump, modello Series 200a, Perkin Elmer
Volume iniettore	20 µL
Colonna di separazione	Gemini®, 5 µm C18, 150×4,6mm Phenomenex (France)
Pre-colonna	Gemini®, 5 µm C18, 4×3,0mm Phenomenex (France)
Temperatura Colonna	25 °C
Fase Mobile	(A) MeOH 0,1% HCOOH; (B) H ₂ O _{ultrapura} 0,1% HCOOH; (C) ACN

Al termine della separazione cromatografica, gli analiti sono stati analizzati mediante uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (3.6.2) munito di sorgente di elettro-nebulizzazione ESI (*Electrospray Ionisation*), operante in modalità positiva e MRM (Multiple Reaction Monitoring). Le condizioni operative dello spettrometro di massa sono riportate in Tabella 2. L'azoto gassoso (N₂) è stato utilizzato sia come "collision" che come "drying" gas. In Tabella 3 sono riportate le transizioni MS/MS per ogni composto e le condizioni operative del metodo. Per il controllo degli strumenti è stato utilizzato il programma "Analyst Software 3.2" di ABSciex.

Tabella 2. Condizioni operative dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

Spettrometro di Massa	API 3000, ABSciex, Germania	
Sorgente di Ionizzazione	Turbo Ion Spray	
Parametri della Sorgente di Ionizzazione	Nebuliser gas	14 units
	Curtain gas	12 units
	Collision gas	8 units
	Ion Spray Voltage	5,5 KV
	Temperatura Sorgente	400 °C
Condizioni di Ionizzazione	Ionizzazione Positiva	
Modalità di Acquisizione degli Ioni	Multiple Reaction Monitoring, come in Tabella 4	

8. VALIDAZIONE DEL METODO

Il metodo sopra descritto è stato sottoposto a procedura di validazione per la determinazione dei contaminanti di interesse in diverse tipologie di matrici ambientali. In particolare, sono state considerate le seguenti matrici: terreno semi-agricolo, digestato prodotto da impianti per la generazione di biogas alimentati con reflui zootecnici e acque fluviali.

8.1 Curve di calibrazione, effetto matrice e limiti di rilevabilità

Sono state ottenute curve di calibrazione analizzando soluzioni standard contenenti i quattro antibiotici di interesse (SMX, N4-SMX, ENR e CIP) a diversa concentrazione. Tutte le soluzioni standard sono state preparate in fase mobile (soluzione trifasica costituita da Fase A (4.9), Fase B (4.10) e Fase C (4.11) 70:20:10 (v/v/v)), alle quali sono stati aggiunti due standard isotopicamente marcati (4.2 e 4.5). Per la quantificazione degli antibiotici negli estratti da matrici solide (suolo, digestato) sono state eseguite due

curve di calibrazione a differenti intervalli di concentrazione: 0,1; 1; 5; 20; 50; 100 e 250 µg/L e 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 5,0 mg/L. Per la quantificazione degli antibiotici negli estratti da campioni di acqua fluviale, sono state eseguite due curve di calibrazione a differenti intervalli di concentrazione: 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 µg/L e 5; 20; 50; 100 e 500 µg/L. La buona linearità era confermata dai coefficienti di correlazione delle curve di calibrazione ($R^2 \geq 0.978$) per tutti gli antibiotici.

Al fine di minimizzare gli effetti di soppressione o incremento del segnale di spettrometria di massa dovuti ad interferenze di matrice, sono stati utilizzati composti marcati con isotopi stabili (4.2 per la classe di antibiotici sulfonamidi e 4.5 per la classe di antibiotici fluorochinoloni), che sono stati aggiunti sia alle soluzioni standard che agli estratti fino a raggiungere una concentrazione finale di 5 µg/L.

I limiti di rilevabilità (LOD) sono stati calcolati, in accordo al metodo IUPAC (Thomson et al., 2002), dalla più bassa concentrazione di analita che produce un picco che può essere distinto in modo affidabile dal rumore di fondo (tre volte il rapporto segnale/rumore). I limiti di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati come 3 volte il valore del LOD (Tabella 4). I valori ottenuti indicano come il metodo sviluppato sia adatto alla determinazione di SMX, N4-SMX, ENR e CIP nelle matrici suolo, digestato ed acqua fluviale. La riproducibilità del metodo LC-MS/MS è stata espressa come coefficiente di variazione (CV, %) calcolato dai risultati di analisi ripetute in triplicato di soluzioni standard addizionate con standard interni (4.2 e 4.5) ed era sempre <10% per tutti gli analiti.

8.2 Prove di recupero dalle matrici ambientali

Sono stati valutati i recuperi percentuali degli antibiotici di interesse dalle matrici ambientali solide e liquide. Per quanto riguarda le matrici solide (suolo e digestato), i campioni sono stati addizionati con concentrazioni note di SMX, N4-SMX, ENR e CIP nell'intervallo 50 µg/kg - 10 mg/kg e successivamente processati come descritto nelle sezioni 5 e 6. Per la quantificazione dei recuperi da matrice solida, sono stati anche

Tabella 3. Parametri LC-MS/MS utilizzati per la determinazione di Sulfametossazolo (SMX), N4-acetilsulfametossazolo (N4-SMX), Enrofloxacin (ENR) e Ciprofloxacin (CIP). DP=deconvolution potential; FP= focusing potential; CE=collision energy e CXP=cell exit potential. (*) indica la transizione utilizzata per la determinazione quantitativa del corrispondente composto.

Classe	Composto	Tempo di ritenzione (min)	Transizione Q1→Q3 [m/z]	DP (V)	FP (V)	CE (V)	CXP (V)
Sulfonamidi	SMX	10,2	254,2→92,2	31,2	75	38,7	16,6
			254,2→108,1			36,0	21,1
			254,2→156,1 (*)			21,1	14,2
	N4-SMX	11,3	296,2→134,1	44	151	29,4	38,3
			254,2→198,2 (*)			23,4	31,6
	SMX-d ₄	10,6	257,9→112,0 257,9→160,0 (*)	44	81	36 25	5 6
Fluorochinoloni	ENR	4,7	360,1→245,2 360,1→316,2 (*)	41	110	31 39	12 19
			332,3→245,3 332,3→288,3 332,3→314,3 (*)			35 25,3 29,7	14,6 18 19,5
	CIP	7,8	365,1→261,2 365,1→321,2 (*)	55	205	39 28	10 11,5
	OFL-d ₃	7,4					

Tabella 4. Nome, tempo di ritenzione, ioni ed energie di collisione delle fragranze usate per la quantificazione in GC-Ion Trap.

Matrice		SMX	N4-SMX	ENR	CIP
SUOLO	LOD µg/kg	0,31	0,28	0,25	0,22
	LOQ µg/kg	0,93	0,84	0,50	0,66
DIGESTATO	LOD µg/kg	0,45	0,50	0,35	0,35
	LOQ µg/kg	1,35	1,50	1,05	1,05
ACQUA FLUVIALE	LOD ng/L	0,15	0,14	0,10	0,11
	LOQ ng/L	0,45	0,42	0,30	0,33

estratti campioni tal quali in modo da tenere conto di eventuali concentrazioni residuali degli antibiotici di interesse già presenti nella matrice.

I campioni di acqua fluviale, precedentemente purificati (sezione 6) al fine di rimuovere le concentrazioni residuali degli analiti di interesse, sono stati addizionati con concentrazioni note di SMX, N4-SMX, ENR e CIP comprese tra 50 e 500 ng/L.

Le prove di recupero, per ciascuna delle concentrazioni note di antibiotico aggiunto alla matrice di partenza, sono state eseguite in triplicato; anche la determinazione analitica dei composti target è stata ripetuta in triplicato per ciascuna matrice addizionata.

I risultati, riportati in Tabella 5, evidenziano come i recuperi siano sempre $\geq 70\%$ e compresi nell'intervallo 71,8-98,7% per i diversi analiti. In particolare, i maggiori recuperi sono stati ottenuti dai campioni solidi o liquidi addizionati con le concentrazioni più elevate di antibiotico. La ripetibilità complessiva ($n = 3$) delle procedure di estrazione è stata soddisfacente, con valori di RSD (deviazione standard relativa) compresi tra 1,6 e 8,5%.

9. APPLICAZIONE DEL METODO A CAMPIONI REALI

La presenza di antibiotici negli ecosistemi naturali è ad oggi considerato uno dei principali rischi per la salute umana e ambientale, quindi il loro monitoraggio, sia per quanto riguarda i composti parentali che i metaboliti, risulta di particolare importanza.

Il metodo descritto è stato utilizzato per la determinazione di sulfonamidi e fluorochinoloni in diverse matrici ambientali. In particolare le matrici considerate erano: un terreno semi-agricolo, digestato anaerobico raccolto da un impianto a produzione di biogas alimentato con reflui zootecnici ed acqua fluviale.

I campioni di terreno sono stati raccolti in un'area non più coltivata negli ultimi 20 anni vicino Roma (42° 06'10"N, 12°38'09"E). Il campionamento è stato eseguito manualmente nello strato superficiale (0-20 cm). Il terreno raccolto è stato essiccato all'aria e quindi setacciato a 2 mm per rimuovere pietre, ghiaia e radici.

I campioni di digestato anaerobico sono stati raccolti da un impianto di digestione anaerobica che produce biogas, ubicato nel Comune di Nepi (Viterbo). Tale impianto utilizza principalmente una miscela di letame di bestiame come biomassa di alimentazione. La potenza nominale dell'impianto è di 750 kW h con un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 15 d (20 d = HRT lungo, 10 d = HRT breve) in un reattore a serba-

toio agitato in continuo (CSTR) funzionante in condizioni mesofile (37 °C).

Il campionamento dell'acqua fluviale è stato eseguito in un tratto del fiume Tevere sottoposto a un'elevata pressione antropica, ubicato a 1 km a valle di un impianto di trattamento delle acque reflue nella zona sud di Roma. I campioni sono stati raccolti manualmente immergendo bottiglie di vetro da 1 L, circa 10 cm sotto la superficie dell'acqua e sono stati trasportati in laboratorio entro 2 ore in un contenitore refrigerato (4 °C).

Tutti i campioni raccolti sono stati processati in triplicato ($n=3$) seguendo il metodo messo a punto.

I risultati ottenuti (Tabella 6) evidenziano come il metodo sviluppato sia adeguato alla determinazione analitica dei composti considerati in diverse matrici ambientali.

CONCLUSIONI

Il metodo messo a punto per la determinazione di antibiotici sulfonamidi e fluorochinoloni consente la determinazione di tali composti in vari comparti ambientali. Il metodo, infatti, minimizza le interferenze derivanti dalla complessità della matrici considerate, consentendo quindi il monitoraggio ambientale degli antibiotici seppur presenti in concentrazioni in traccia (ng/L e µg/Kg, rispettivamente per matrici liquide e solide).

BIBLIOGRAFIA

COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2018/840 OF 5 JUNE 2018. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32018D0840>.

CYCONÍ M., MROZIK A. AND PIOTROWSKA-SEGET Z. (2019): "Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity", *Frontiers in Microbiology*, 10, 338.

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.

GRENNI P., ANCONA V., BARRA CARACCILO A. (2018): "Ecological effects of antibiotics on natural

ecosystems: a review", *Microchemical Journal*, 136, 25-39.

LOOS R., GAWLIK B.M., LOCORO G. (2008): EU wide monitoring survey of polar persistent pollutants in European river waters. JRC Scientific and Technical Reports, 1-51.

LOOS R., CARVALHO R., ANTÓNIO D.C., COMERO S., LOCORO G., TAVAZZI S., PARACCHINI B., GHIANI M., LETTIERI T., BLAHA L., JAROSOVA B., VOORSPOELS S., SERVAES K., HAGLUND P., FICK J., LINDBERG R.H., SCHWESIG D., GAWLIK B.M. (2013): "EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents", *Water Research* 47 (17), 6475-6487.

PATROLECCO L., CAPRI S., ADEMOLLO N. (2015): "Occurrence of selected pharmaceuticals in the principal sewage treatment plants in Rome (Italy) and in the receiving surface waters", *Environmental Science and Pollution Research*, 8 (22), 5864-5876.

PENA, A., CHMIELOVA, D., LINO, C. M., & SOLICH, P. (2007). Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *Journal of separation science*, 30(17), 2924-2928

PRIETO-RODRIGUEZ L., MIRALLES-CUEVAS S., OLLER I., AGÜERA A., LI PUMA G., MALATO S. (2012): "Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO₂ concentrations", *Journal of Hazardous Materials*, 211-212, 131-137.

RAJESH KUMAR R., TAEK LEE J., YOUNG CHO J. (2012): "Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment", *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55 (6) 701-709.

RAUSEO J., BARRA CARACCIOLO A., ADEMOLLO N., CARDONI M., DI LENOLA M., GAZE W., STANTON I., GRENNI P., PESCATORE T., SPATARO F., PATROLECCO L. (2019); "Dissipation of the antibiotic sulfamethoxazole in a soil amended with anaerobically digested cattle manure", *Journal of Hazardous Materials*, 378, 120769.

SPATARO F., ADEMOLLO N., PESCATORE T., RAUSEO J., AND PATROLECCO L., (2019): "Antibiotic residues and endocrine disrupting compounds in municipal wastewater treatment plants in Rome, Italy" *Microchemical Journal* 148, 634-642.

THOMPSON M., ELLISON S.L.R., WOOD R. (2002): "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)", *Pure and Applied Chemistry*, 74 (5), <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.

Determinazione del metilmercurio in sedimenti e biota d'acqua dolce mediante Analizzatore Automatico di Mercurio e GC-MS

a cura di

Lucia Valsecchi, Claudio Roscioli, Clara Zanini, Alfredo Schiavon, Licia Guzzella, Laura Marziali(*), Istituto di Ricerca Sulle Acque (CNR-IRSA) - Brugherio (MB)

RIASSUNTO

Negli ecosistemi d'acqua dolce il mercurio è adsorbito principalmente nei sedimenti, dove può essere parzialmente convertito in metilmercurio (MeHg), un composto del mercurio più tossico e bioaccumulabile rispetto alle forme inorganiche. La sua analisi può fornire quindi utili informazioni per valutare il rischio ambientale legato alla contaminazione da mercurio. La determinazione del MeHg nelle matrici ambientali risulta spesso difficile per le basse concentrazioni e per la presenza di diversi interferenti. Scopo di questo lavoro è sviluppare e confrontare due protocolli per l'analisi del MeHg in campioni di organismi e di sedimenti d'acqua dolce, mediante Analizzatore Automatico di Mercurio (AMA 254) e mediante GC-MS. La valutazione dei metodi è stata effettuata tramite analisi di materiali di riferimento certificati e di campioni di invertebrati bentonici di fiume, pesci e sedimenti lacustri. La metodica in AMA 254 prevede una doppia estrazione liquido-liquido con toluene e L-cisteina. Il protocollo in GC-MS utilizza la tecnica dello spazio di testa statico, usando il metodo di quantificazione della diluizione isotopica con standard interno. Entrambe le metodiche hanno mostrato una buona performance, con recuperi dell'86-102 % rispetto ai valori certificati e coefficienti di variazione (CV) del 2,5-13,2 %. Per i campioni naturali, la ripetibilità è risultata buona, con CV inferiori al 20 %. Il limite di quantificazione calcolato per il metodo in AMA 254 ($21 \mu\text{g MeHg kg}^{-1}$) può risultare non adeguato per l'analisi di sedimenti naturali, mentre il metodo in GC-MS risulta più sensibile ($\text{LOQ} = 1,4 \mu\text{g MeHg kg}^{-1}$). Una comparazione preliminare tra i due metodi sembrerebbe indicare equivalenza, nonostante la metodica in GC-MS dia recuperi tendenzialmente più alti rispetto a quella in AMA 254.

SUMMARY

In freshwater ecosystems mercury is mainly adsorbed on sediments and it can be partially transformed into methylmercury (MeHg), which is more toxic than inorganic species of mercury and shows higher bioaccumulation capability. Thus, MeHg analysis can provide useful information for environmental risk assessment in mercury contaminated sites. The determination of MeHg in environmental matrices is often difficult due to low concentrations and to the presence of interfering substances. The aim of this work is to develop and compare two analytical protocols for the analysis of MeHg in freshwater organisms and sediments, by using an Automated Mercury Analyzer (AMA 254) and by GC-MS. The evaluation of the methods was carried out by analysis of certified reference materials and samples of riverine benthic invertebrates, as well as lacustrine fish and sediments. AMA 254 protocol involves a double liquid-liquid extraction with toluene and L-cysteine. GC-MS protocol is carried out by static headspace, using the internal standard isotopic dilution quantification method. Both methods showed a good performance, with recoveries of 86-102 % compared to certified values and with variation coefficients (CV) of 2.5-13.2 %. For natural samples, repeatability was good, with CVs below 20 %. The quantification limit calculated for AMA 254 protocol ($21 \mu\text{g MeHg kg}^{-1}$) may be not adequate for the analysis of natural sediments, while GC-MS protocol proved to be more sensitive ($\text{LOQ} = 1.4 \mu\text{g MeHg kg}^{-1}$). A preliminary comparison between methods showed potential agreement, even if GC-MS protocol generally showed higher recoveries than AMA 254 protocol.

1. INTRODUZIONE

Negli ecosistemi d'acqua dolce il mercurio tende ad essere adsorbito principalmente nei sedimenti, dove può essere convertito in metilmercurio (CH_3Hg^+ , MeHg) ad opera di batteri anaerobi, ed essere così rilasciato in fase disciolta e trasferirsi al biota (Ullrich et al., 2001; Marziali e Valsecchi, 2017). Il metilmercurio è considerevolmente più tossico delle specie inorganiche del mercurio e bioaccumula nei tessuti degli organismi in modo più efficiente, poiché si combina facilmente con gli anioni contenenti zolfo e con i gruppi solfidrilici ($-\text{SH}$) presenti negli amminoacidi (soprattutto della cisteina), formando legami covalenti che ne limitano l'eliminazione. Per questa ragione, il

MeHg mostra una spiccata capacità di biomagnificare nelle catene trofiche: le concentrazioni, infatti, così come la percentuale di MeHg rispetto al mercurio totale (THg), tendono ad aumentare con il livello trofico (Ullrich et al., 2001; Guzzella et al., 2018). Queste proprietà ne determinano il trasferimento ai più alti livelli delle catene trofiche, compreso l'uomo.

Di conseguenza, in un'ottica di rischio ecologico, la determinazione della concentrazione di MeHg, associata a quella del mercurio totale, sia nei comparti abiotici (acqua, sedimenti) che in diversi organismi appartenenti alla catena alimentare acquatica, costituisce un'informazione importante per individuare le sorgenti, i percorsi e i potenziali recettori della contaminazione (Hintelmann e Nguyen, 2005). Ad esem-

* marziali@irsa.cnr.it

pio, diversi studi evidenziano il ruolo cruciale svolto dagli invertebrati bentonici, che vivono a contatto con i sedimenti e che sono alla base delle reti trofiche acquatiche, nel trasferire la contaminazione dalle matrici abiotiche al biota (Pisanello et al., 2016; Marziali et al., 2017).

La determinazione analitica del MeHg, tuttavia, non viene svolta routinariamente nel monitoraggio ambientale, e gli Standard di Qualità Ambientale sono riferiti al mercurio totale (D. Lgs. 172/2015). Una delle ragioni di questa scelta è riconducibile alle difficoltà analitiche nella determinazione della frazione organica del mercurio in alcune matrici ambientali: le concentrazioni molto basse e la presenza di interferenti (solfuri, acidi umici, aminoacidi e proteine in grado di legare fortemente il metilmercurio) sono le principali complicazioni analitiche (Caricchia et al., 1997; Carrasco et al., 2007; Maggi et al., 2009). Diversi protocolli sono stati messi a punto per l'analisi del MeHg in organismi acquatici destinati al consumo umano, sia utilizzando analizzatori diretti di mercurio che mediante cromatografia (Azemard e Vassileva, 2015; Watanabe et al., 2015; Maggi et al., 2009), mentre sono pochi gli studi riferiti a invertebrati d'acqua dolce (es. Riva-Murray et al., 2011). Poco indagati risultano anche i sedimenti, nonostante siano considerati una delle principali fonti di metilmercurio nell'ambiente (Ullrich et al., 2001; Maggi et al., 2009).

La determinazione di MeHg comporta le seguenti fasi analitiche: 1) estrazione, 2) separazione e 3) determinazione (Carrasco et al., 2007).

L'estrazione può essere condotta in ambiente alcalino, mediante KOH o idrossido di tetrametilammonio, o in ambiente acido, mediante HCl, HBr, CH₃COOH o HNO₃, a temperatura ambiente o ad alta temperatura mediante l'impiego di stufe, microonde o ultrasuoni (Carrasco et al., 2007). La fase di estrazione è particolarmente delicata, in quanto il MeHg potrebbe essere liberato solo in parte, oppure potrebbero verificarsi artefatti dovuti alla distruzione o formazione di specie di organomercurio (Maggi et al., 2009).

La separazione è comunemente eseguita mediante l'uso di gascromatografi (GC) (Carrasco et al., 2009), cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) (Jagtap et al., 2011) o elettroforesi a zona capillare (CZE) (Silva da Rocha et al., 2001). Queste tecniche possono essere accoppiate a spettrometria a fluorescenza atomica (AFS) e a spettrometria di massa al plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS) per la rivelazione dei composti (Hight and Cheng, 2006; Hintelmann e Nguyen, 2005; Carrasco e Vassileva, 2015).

La gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) è una tecnica frequentemente utilizzata per l'analisi del MeHg (Rodríguez Martín-Doimeadios et al., 2002; Yang et al., 2003; Beceiro-González et al., 2009; Cavalheiro et al., 2014). Poiché il mercurio elementare e molti composti inorganici e organici del mercurio sono volatili, la gascromatografia può condurre con successo alla separazione dei composti del mercurio, che possono quindi essere identificati e quantificati individualmente mediante spettrometria di massa. Il principale svantaggio di

questa tecnica è la necessità di derivatizzare il MeHg ionico in specie volatili. Sono stati proposti diversi reagenti di derivatizzazione che consentono la separazione e l'identificazione dei derivati del metilmercurio, dell'etilmercurio e del mercurio inorganico (Fernández et al., 2000). L'uso degli organoborati come reagenti di derivatizzazione (principalmente tetraetilborato di sodio, NaBEt₄) semplifica le procedure poiché l'etilazione avviene nel mezzo acquoso e l'estrazione delle specie volatili può essere ottenuta in un'unica fase (Jimenez e Sturgeon, 1997). Inoltre, questi composti vengono isolati dalla matrice liquida appena prima della separazione gascromatografica, eliminando così la necessità di estrazione con solvente (Liang et al., 1994; 1996). Seguendo questo approccio, la procedura sviluppata da Carrasco et al. (2007) consiste in una etilazione in fase acquosa con NaBEt₄, successiva microestrazione in fase solida (SPME) e, infine, rivelazione in GC-MS. Chen et al. (2004) hanno proposto la determinazione in GC-MS dopo digestione in microonde, etilazione con NaBEt₄ ed estrazione con solvente. Yang et al. (2003) hanno adottato una calibrazione per diluizione isotopica specie-specifica mediante microestrazione in fase solida (SPME) in combinazione con GC-MS, dopo etilazione con NaBPr₄ (sodio tetrafenilborato) o NaBEt₄.

Un approccio diverso per la determinazione del mercurio organico si basa sull'uso di analizzatori automatici e diretti di mercurio progettati per l'analisi del mercurio totale (Alfonso et al., 2008; Carbonell et al., 2009; Calderón et al., 2013; Cordeiro et al., 2013). Questa tecnica è utilizzata generalmente per analizzare tessuti di organismi (invertebrati marini e pesci), mentre l'applicazione per l'analisi dei sedimenti è scarsamente riportata in letteratura (Agah et al., 2007; Maggi et al., 2009; Azemard and Vassileva, 2015; Squadrone et al., 2015). In particolare, non sembra utilizzata per l'analisi di sedimenti d'acqua dolce.

Lo scopo di questo lavoro è di sviluppare e confrontare due metodi analitici per l'analisi di MeHg in campioni di organismi e di sedimenti d'acqua dolce, usando due diversi sistemi analitici: I) mediante Analizzatore Automatico di Mercurio (AMA 254) dopo doppia estrazione liquido-liquido, per una validazione del protocollo di Calderón et al. (2013); II) in GC-MS mediante spazio di testa statico, usando il metodo di quantificazione della diluizione isotopica con standard interno (IS). Le prestazioni dei metodi sono valutate mediante analisi di materiali di riferimento certificati. Entrambe le tecniche sono testate per l'analisi di MeHg in invertebrati nativi di fiume (insetti, crostacei), pesci e sedimenti lacustri.

2. PRINCIPIO DEL METODO

L'analisi condotta utilizzando la doppia estrazione liquido-liquido e l'Analizzatore Automatico di Hg si basa sulla capacità del metilmercurio di creare legami covalenti stabili con i gruppi -SH presenti negli aminoacidi, in particolare nella L-cisteina.

L'etilazione del MeHg con NaBEt₄ e la concentrazione nello spazio di testa è invece alla base del metodo proposto in GC-MS.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Entrambe le metodiche possono essere utilizzate per l'analisi di organismi (pesci, invertebrati) e sedimenti d'acqua dolce.

4. CAMPIONAMENTO

La validazione è condotta analizzando 4 diversi materiali certificati comprendenti sedimenti e organismi (Tabella 1).

L'applicabilità è testata su campioni di sedimenti e organismi raccolti nel Lago Maggiore e nel suo principale tributario, il Fiume Toce, nell'ambito delle attività di monitoraggio della Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere (CIP AIS) (www.cipais.org) (Tabella 1). I campioni vengono preventivamente liofilizzati a basse temperature e vuoto spinto, e omogeneizzati tramite micromulino. Le analisi dei sedimenti sono condotte sulla frazione passante al vaglio dei 63 µm.

5. INTERFERENZE

Risulta essere molto importante la fase di estrazione che deve essere robusta, veloce, efficiente, portare a risultati affidabili e, soprattutto, deve preservare l'integrità della specie chimica di origine. Ad esempio, Maggi et al. (2009) hanno riscontrato con un Analizzatore di mercurio uno scarso recupero per il materiale di riferimento DOLT-3 (tessuto di pesce), probabilmente a causa del contenuto lipidico relativamente elevato, che ha determinato la formazione di un'emulsione in fase estrattiva, limitando l'effetto del solvente. Gli stessi autori riportano la possibilità di ottenere artefatti dovuti alla distruzione o formazione di specie di organomercurio (scambio interspecie).

La presenza di sostanze interferenti (solfuri, acidi umici, aminoacidi e proteine in grado di legare fortemente il MeHg) è invece la principale complicazione analitica nei sedimenti (Caricchia et al., 1997), a cui si aggiungono le difficoltà di determinazione dovute alle basse concentrazioni che spesso li caratterizzano. Infatti, la percentuale di MeHg nei sedimenti d'acqua dolce è molto contenuta rispetto al THg, generalmente inferiore al 5 % (Lambertsson e Nilsson, 2006; Castelle et al., 2007; Razavi et al., 2013).

6. METODO I: Analizzatore Automatico di Mercurio

L'analisi è effettuata seguendo il protocollo di Calderón et al. (2013). Il metodo prevede una estrazione liquido-liquido con toluene, seguita da un'altra con L-cisteina, e si basa sull'affinità di MeHg per il gruppo tiolico della cisteina.

6.a APPARECCHIATURE

- 6a.1 Analizzatore Automatico di Mercurio (AMA 254, FKV)
- 6a.2 Bilancia analitica con risoluzione 0,1 mg
- 6a.3 Bilancia tecnica con risoluzione di 0,01 g
- 6a.4 Centrifuga (minimo 3000 rpm)
- 6a.5 Navicella in quarzo (o nichel) per AMA 254 da 500 µL

Tabella 1. Elenco dei materiali certificati e dei campioni naturali analizzati. Per ogni campione si identifica la tipologia e la provenienza.

Matrice	Tipologia	Provenienza
ERM-CC580	Sedimento di estuario (materiale certificato)	European Commission – Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements
SRM-2974a	Cozza comune <i>Mytilus edulis</i> (materiale certificato)	NIST – National Institute of Standards & Technology
SRM-1946	Trota di lago (<i>Salvelinus namaycush namaycush</i>) (materiale certificato)	NIST – National Institute of Standards & Technology
BCR-CRM414	Plankton marino (materiale certificato)	European Commission – Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements.
Agone	Pesce lacustre	Lago maggiore
<i>Anphipoda Gammaridae</i>	Macrobenthos, Crostacei	Fiume Toce
<i>Ephemeroptera Heptageniidae</i>	Macrobenthos, Insetti	Fiume Toce
<i>Trichoptera Limnephilidae</i>	Macrobenthos, Insetti	Fiume Toce
<i>Plecoptera Perla</i>	Macrobenthos, Insetti	Fiume Toce
LM PB 27	Sedimento lacustre	Lago Maggiore
PAL-L	Sedimento lacustre	Lago Maggiore

6a.6 Vetreria di laboratorio (precedentemente condizionata in HNO₃ 10 % per 24 ore e risciacquata in acqua MilliQ®)

6a.7 Agitatore automatico Vortex

6.b REATTIVI

- 6b.1 Acetato di sodio (CH₃COONa)
- 6b.2 Acido bromidrico 48 % (HBr)
- 6b.3 Acqua MilliQ® (o ultrapura)
- 6b.4 Bicromato di potassio (K₂CrO₄)
- 6b.5 L-cisteina cloridrato monoidrato (C₃H₈ClNO₂S * H₂O)
- 6b.6 Solfato di sodio (Na₂SO₄)
- 6b.7 Standard di mercurio (1000 mg Hg L⁻¹)
- 6b.8 Toluene (C₇H₈)

6.c PREPARAZIONE DEI REAGENTI E DEGLI STANDARD

Si prepara una soluzione di K₂CrO₄ 1 % sciogliendo 1 g di K₂CrO₄ in MilliQ® portando al volume di 100 mL (la soluzione è stabile per 2 anni a 2-10 °C). La soluzione è utilizzata per la preparazione della soluzione 10 mg Hg L⁻¹: essa è ottenuta diluendo 1 mL dello standard di mercurio in una soluzione contenente 1

mL di $K_2Cr_2O_4$ 1 %, 2 mL di HCl 1:1 e 96 mL di MilliQ®. La soluzione è stabile per 6 mesi a 2-10 °C.

Questa soluzione è utilizzata per preparare le soluzioni di calibrazione mediante diluizione in L-cisteina 1 % (12,5 g CH_3COONa , 0,8 g Na_2SO_4 e 1 g di L-cisteina portando con MilliQ® a volume di 100 mL). Le soluzioni di calibrazione e quella di L-cisteina devono essere preparate subito prima dell'uso.

6.d CARATTERISTICHE STRUMENTALI

Per la determinazione analitica occorre impostare i tempi di essiccazione (*drying*) e di decomposizione termica (*decomposition*) rispettivamente a 250 e 150 secondi. Il volume richiesto per ciascuna analisi (bianchi, campioni naturali o certificati o soluzioni di calibrazione) è di 500 µL.

6.e. CALIBRAZIONE, VALIDAZIONE, LOD E LOQ

La retta di calibrazione è ottenuta confrontando i valori di assorbanza delle soluzioni di calibrazione con la loro concentrazione nominale. Essa è calcolata tra 1 e 100 µg Hg L⁻¹, con 10 punti di calibrazione. Le concentrazioni ottenute sono espresse come µg Hg L⁻¹. Per ottenere la concentrazione di MeHg nel campione si applica la seguente formula:

dove: 6 è il volume di L-cisteina 1 % (mL);
C è la concentrazione di Hg nell'estratto (µg Hg L⁻¹) determinata mediante la retta di calibrazione;
w è il peso del campione (g);

$$MeHg (\mu g kg^{-1}) = \frac{6 * C}{w} * f$$

f è il rapporto tra il peso molecolare del MeHg e del Hg (1,075), utile per convertire il valore espresso come Hg in MeHg.

Poiché gli analizzatori di mercurio presentano una risposta molto stabile nel tempo, non occorre ripetere la calibrazione prima di ogni sessione di analisi. Si consiglia in ogni caso di verificare l'accuratezza mediante analisi periodica di soluzioni standard e materiali certificati. La ricalibrazione va generalmente effettuata dopo un anno e alla sostituzione del catalizzatore.

Come bianco di analisi viene considerata la soluzione

di L-cisteina 1%.

L'accuratezza e la precisione del metodo sono testate mediante analisi di 4 materiali certificati con matrice ambientale differente, analizzati con 3-6 repliche ciascuno (Tabella 2). Per quanto riguarda le matrici biologiche, il recupero è risultato compreso tra il 97 % e il 100 % rispetto al valore certificato, mentre per il sedimento il recupero è dell'87 %, con coefficiente di variazione (CV) compreso tra 2,5 % e 10 % (Tabella 2).

Per il calcolo del limite di rivelabilità (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ), viene preparata una soluzione di MeHg i cui valori di assorbanza siano circa 10 volte il valore del bianco: l'LOD è stato calcolato come media di 10 valori di assorbanza + 3 volte la deviazione standard e l'LOQ come media di 10 valori di assorbanza + 10 volte la deviazione standard. I valori ottenuti sono rispettivamente 7 µg MeHg kg⁻¹ e 21 µg MeHg kg⁻¹.

6.f. ANALISI DEI CAMPIONI

Ad una aliquota di 0,15-0,20 g p.s. di campione si aggiungono 10 mL di HBr e si omogeneizza la soluzione in provetta mediante agitazione con Vortex per circa 2 min. Si procede poi ad una estrazione liquido-liquido in toluene: si aggiungono 20 mL di toluene, si omogeneizza la soluzione mediante agitatore Vortex per 2 min e si sottopone il preparato a centrifugazione (5000 rpm per 10 min) per separare la fase inorganica da quella organica. Si procede al recupero del surnatante (fase organica, circa 15 mL) e lo si trasferisce in una seconda provetta in cui si aggiungono 6 mL di soluzione di L-cisteina; alla fase sottostante, rimasta all'interno della prima provetta, si aggiungono nuovamente 15 mL di toluene e si procede come nella fase precedente (agitazione, centrifuga). Al termine di questa fase si recupera il surnatante, che viene aggiunto al precedente estratto nella seconda provetta; dopo miscelazione e centrifugazione (5000 rpm per 10 min), si recupera la fase sottostante, di cui 500 µL sono inseriti direttamente nella navicella per la determinazione in AMA 254 (Figura 1).

7. METODO II: Gascromatografo accoppiato a spettrometro di massa

Dopo l'etilazione in fase acquosa con la formazione di

Tabella 2. Materiali certificati utilizzati per l'analisi del MeHg mediante i due metodi. Si riportano i valori certificati di MeHg e le concentrazioni determinate sperimentalmente (media±Deviazione Standard), il numero di analisi effettuate (n), il recupero percentuale (R%), la precisione (CV%), il limite di rilevabilità (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ).

materiale certificato	Valore certificato		AMA 254				GC-MS			
	µg kg ⁻¹ p.s.+ D.S.	n.	µg kg ⁻¹ p.s.±D.S.	R%	CV%	n.	µg kg ⁻¹ p.s.±D.S.	R%	CV%	
ERM-CC580	75,5±0,04	6	66 ± 2,4	87	3,7	4	71± 9,4	94	13,2	
SRM-2974a	69 ± 0,81	4	67 ± 6,2	97	10	3	71± 2,4	102	3,4	
SRM-1946	1376 ± 52	3	1246 ± 30,8	91	2,5	3	1399± 27	102	6,7	
BCR-CRM414	200	4	195 ± 15,2	97	7,8	4	196± 8,45	86	4,3	
			LOD = 7 µg kg ⁻¹				LOD = 0,7 µg kg ⁻¹			
			LOQ = 21 µg kg ⁻¹				LOQ = 1,4 µg kg ⁻¹			

metiletilmercurio (MeHgEth), quest'ultimo può essere estratto con un solvente organico (estrazione liquido-liquido) compatibile per l'analisi diretta in GC (Cavalheiro et al., 2014). In questo step, tuttavia, è possibile che il solvente organico estragga anche alcuni interferenti, che possono ridurre le prestazioni del sistema cromatografico e la sensibilità. Per questo motivo, dopo la digestione con HCl (Vazquez et al., 1997; Hinojosa Reyes et al., 2011) e la derivatizzazione in soluzione acquosa a pH 5,5 (Chen et al., 2004), viene effettuata una concentrazione del MeHgEth nella fase vapore mediante spazio di testa statico, alla temperatura di 90 °C. Questa tecnica estrae meno interferenti rispetto all'estrazione liquido-liquido e risulta più semplice da attuare, permettendo il recupero degli analiti volatili. Per quanto riguarda il metodo di quantificazione, la diluizione isotopica è stata applicata con successo ai campioni biologici per l'analisi del MeHg, e i risultati ottenuti mostrano miglior ripetibilità rispetto ad altri metodi (Navarro et al., 2013). Nel presente metodo la quantificazione è effettuata mediante diluizione isotopica con una soluzione arricchita di ^{201}Hg .

7.a APPARECCHIATURE

- 7a.1 Bilancia analitica con risoluzione 0,1 mg
- 7a.2 Bilancia tecnica con risoluzione di 0,01 g
- 7a.3 Filtri in acetato di cellulosa (CA), porosità 0,4 μm
- 7a.4 Gascromatografo Focus GC accoppiato ad uno spettrometro di massa DSQ singolo quadrupolo e autocampionatore Triplus per spazio di testa statico (Thermo Fisher)
- 7a.5 Estrattore a microonde
- 7a.6 Vetreria di laboratorio (preventivamente condizionata con acetone)
- 7a.7 Agitatore automatico Vortex

7.b REATTIVI

- 7b.1 Acetato di sodio (CH_3COONa)
- 7b.2 Acido acetico glaciale (CH_3COOH)
- 7b.3 Acido cloridrico 37 % (HCl)
- 7b.4 Acqua MilliQ® (o ultrapura)
- 7b.5 Cloruro di metilmercurio (MeHgCl)
- 7b.6 Metanolo (CH_4O)
- 7b.7 Monometilmercurio arricchito con ^{201}Hg (^{201}Hg , $5,49 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$, 96,5 %)
- 7b.8 Potassio idrossido (KOH)
- 7b.9 Sodio tetraetilborato NaBET_4 (97 %)

7.c PREPARAZIONE DEI REAGENTI E DEGLI STANDARD

Viene preparata una soluzione buffer $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 1 mol a pH 5 utilizzando 17,2 mL di acido acetico glaciale e 95,3 g di acetato di sodio portati a 1000 mL con acqua MilliQ®. Inoltre vengono preparate le seguenti soluzioni: KOH 1 M (56 g di KOH in 1000 mL di MilliQ®), HCl 1 M (82,8 mL di acido in 1000 mL di MilliQ®) e NaBET_4 1 % (100 mg di NaBET_4 97 % in 10 mL di MilliQ®, preparata giornalmente). Una soluzione $34,4 \text{ mg MeHg L}^{-1}$ si ottiene sciogliendo 10 mg di MeHgCl in 250 mL di metanolo; questa soluzione è poi diluita a $0,0344 \text{ mg MeHg L}^{-1}$ (1 mL in

Tabella 3. Descrizione delle principali caratteristiche strumentali del GC-MS.

INIETTORE	
Tipo iniezione	Split
Split ratio	1:10
Volume iniettato (mL)	1,2
Temperatura (°C)	110
COLONNA	
Tipo di colonna	SUPELCO SLB-5MS 30m X 0.25mm X 0.25 μm
Gas di trasporto	Elio 6,0
Flusso (mL min ⁻¹)	1,1
Isotherma 1 (°C)	50
Tempo 1 (min)	1
Rampa 1 (°C min ⁻¹)	8
Isotherma 2 (°C)	80
Tempo 2 (min)	0
Rampa 2 (°C min ⁻¹)	25
Isotherma 3 (°C)	250
Tempo (min)	0
Acquisizione	SIM
Ioni monitorati Me^{201}Hg (m/z)	216+245
Ioni monitorati MeHg (m/z)	215+244
Temperatura sorgente (°C)	175
Temperatura transfer line (°C)	175
Polarità	+
Ionizzazione	EI 70 eV

1000 mL MilliQ® in 1 % HCl). I campioni sono arricchiti con lo standard interno a $0,059 \mu\text{g MeHg mL}^{-1}$ (1 mL di ^{201}Hg in 99 mL di MilliQ® 1 % HCl).

7.d CARATTERISTICHE STRUMENTALI

Le condizioni cromatografiche e dello spettrometro di massa sono riportate in Tabella 3. L'analisi è condotta in SIM (*Selected Ion Monitoring*) acquisendo i frammenti principali di MeHg e Me^{201}Hg .

7.e CALIBRAZIONE, VALIDAZIONE, LOD E LOQ

La calibrazione è eseguita applicando il metodo dello standard interno (IS): a soluzioni a concentrazioni note di MeHg è stata aggiunta la stessa quantità di standard interno (IS) Me^{201}Hg . La retta di taratura è poi ottenuta utilizzando i rapporti dei valori di area e di concentrazione di MeHg e Me^{201}Hg . I limiti della retta sono studiati per coprire il range di concentrazione previsto per i campioni naturali: si sono calcolati i valori attesi di MeHg applicando la sua percentuale rispetto al THg, ricavata da dati di bibliografia (Carbonell et al., 2009; Hajeb et al., 2009).

Le concentrazioni sono ottenute con il metodo dello

Tabella 4. Concentrazioni di MeHg in campioni di organismi e sedimenti d'acqua dolce. Sono indicate il numero di analisi effettuate per ogni campione per ciascun metodo (n), il valore medio di concentrazione, la deviazione standard (D.S.) e il coefficiente di variazione (CV%). Inoltre sono riportati i valori di mercurio totale (THg, media $\pm$ D.S.) e la percentuale di MeHg per ciascun campione (%MeHg).

	AMA 254						GC-MS				
	THg $\mu\text{g kg}^{-1}$ p.s. $\pm$ D.S.	n.	MeHg $\mu\text{g kg}^{-1}$ p.s.	D.S.	CV%	% MeHg	n.	MeHg $\mu\text{g kg}^{-1}$ p.s.	D.S.	CV %	% MeHg
<i>Agone</i>	585 $\pm$ 8	3	533	42,4	8	91	3	595	29,8	5	102
<i>Gammaridae</i>	125 $\pm$ 1	3	96	0,9	0,9	77	3	101	6,3	6,2	81
<i>Heptageniidae</i>	79 $\pm$ 5	3	53	4,2	8,0	68	3	56	4,9	8,7	71
<i>Limnephilidae</i>	98 $\pm$ 4	3	63	10,9	17,1	65	3	60	1,2	2	62
<i>Perla</i>	128 $\pm$ 2	3	113	12,8	11,3	88	3	121	0,9	0,7	94
LM PB 27	3100 $\pm$ 13	6	<LOD	-	-	-	3	6	0,8	13,1	0,2
PAL-L	4700 $\pm$ 80	6	<LOD	-	-	-	3	26	0,8	3,2	0,6

standard interno, considerando i rapporti massa/carica (m/z) corrispondenti agli ioni $[\text{CH}_3\text{-Hg}]^+$ e $[\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_2\text{CH}_3]^+$ (Tabella 3). Data la distribuzione isotopica naturale del mercurio, c'è un contributo incrociato tra il segnale dato dallo standard interno arricchito di ^{201}Hg (0,89 % di ^{200}Hg , che si aggiunge al segnale del ^{200}Hg naturale) e quello dato dal mercurio naturale (13,2 % di ^{201}Hg , che si aggiunge al segnale dello standard interno) (Figura 2). Questi contributi sono verificati sperimentalmente analizzando standard interno Me^{201}Hg e MeHg: i valori medi ottenuti sono inseriti nel software di quantificazione (Xcalibur 1.4) per ottenere le concentrazioni corrette. Inoltre, la quantità di IS è aggiunta ad ogni campione considerando la concentrazione naturale stimata di MeHg, per ottenere un rapporto MeHg/IS ottimale per la quantificazione.

La validazione è effettuata analizzando materiali certificati di organismi e di sedimento (Tabella 2). Per

entrambe le matrici, si osserva un buon accordo con i valori attesi, con un recupero compreso tra 86 % e 102 %. La ripetibilità (CV) risulta compresa tra 3,4 % e 13,2 % (Tabella 2). I valori di LOQ e LOD sono calcolati usando rispettivamente un'area il cui segnale è 3 e 5 volte superiore alla linea di base: sono stati così ottenuti un LOQ di $1,4 \mu\text{g MeHg kg}^{-1}$ e un LOD di $0,7 \mu\text{g MeHg kg}^{-1}$.

7.f ANALISI DEI CAMPIONI

A 0,25-0,50 g p.s. per i campioni biologici e 0,5-1,0 g p.s. per i sedimenti sono aggiunti 0,5 mL della soluzione diluita di standard interno Me^{201}Hg . L'estrazione è ottenuta aggiungendo 3 mL di HCl 1 M e sottoponendo il campione a microonde a 70°C per 3 min. Il campione è lasciato raffreddare e si aggiungono 10 mL di soluzione buffer di acetato e 3 mL di KOH 1 M per riportare il pH a 5,5, ottimale per l'etilazione. Viene così trasferito quantitativamente nella vial per spazio di testa (previa filtrazione in caso di campioni molto torbidi), si aggiunge 1 mL di NaBEt_4 1 % e si incuba per 12 minuti a 90°C ; infine 1,2 mL di spazio di testa sono iniettati nel GC-MS (Figura 3, Figura 4).

8. PROTOCOLLO METODOLOGICO

Entrambi i metodi sono stati valutati per l'analisi di campioni di organismi e sedimenti raccolti in ecosistemi d'acqua dolce (Tabelle 1 e 4). Il range di concentrazione testato può essere rappresentativo delle concentrazioni attese per questo tipo di campioni (tra 6 e $1376 \mu\text{g kg}^{-1}$ p.s. di MeHg).

Sono stati analizzati organismi appartenenti a gruppi tassonomici differenti (cioè potenzialmente con una matrice diversa) e con diversi livelli di THg: invertebrati bentonici (insetti, crostacei) e

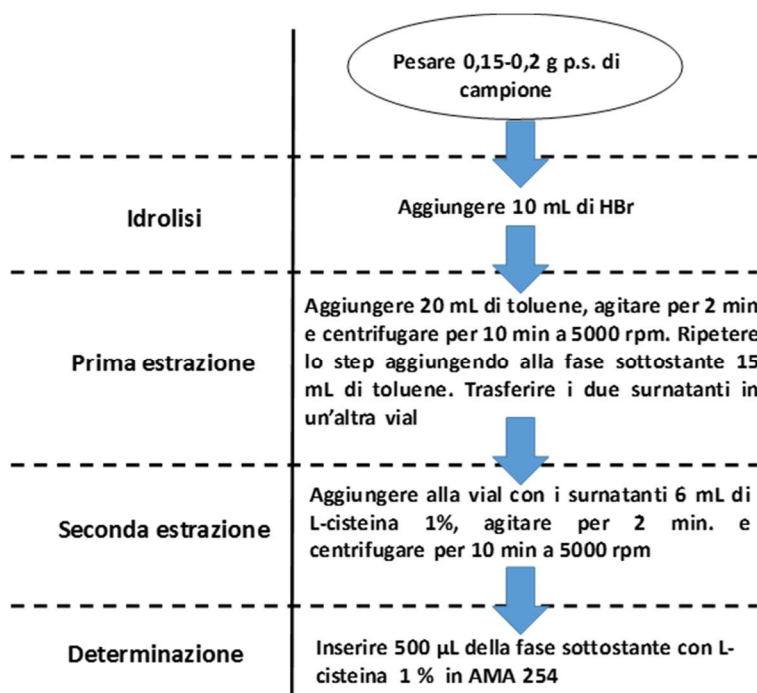


Figura 1. Procedura per la determinazione del MeHg mediante Analizzatore Automatico di Mercurio.

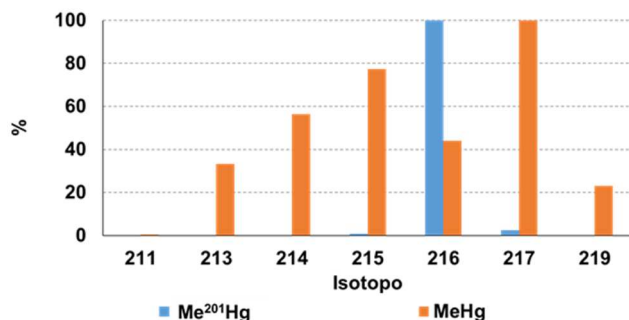


Figura 2. Distribuzione isotopica del metilmercurio in spettrometria di massa (100 % = ione più abbondante).

pesci. Entrambi i metodi hanno determinato con successo il MeHg con una buona precisione ($CV \leq 17,1\%$ per il metodo con AMA 254 e $CV \leq 8,7\%$ per il metodo in GC-MS). I valori ottenuti sono poi confrontati con i valori di mercurio totale per verificare la selettività dei metodi nel caso di valori concentrazioni di THg e MeHg poco differenti.

Non è stato possibile quantificare le concentrazioni nei sedimenti naturali mediante AMA 254, in quanto i valori sono risultati inferiori all'LOD. Sono state effettuate alcune prove estraendo quantitativi maggiori di sedimento (0,4 g e 0,6 g), ma i valori ottenuti sono risultati significativamente inferiori rispetto a quelli ottenuti in GC-MS. Probabilmente, aumentando la quantità di campione, la quantità di reagenti come l'acido bromidrico non è sufficiente per disgregare i legami tra MeHg e sostanza organica: l'estrazione risulta così solo parziale. Un'ulteriore prova è stata quella di utilizzare HCl al posto di HBr, come indicato in Maggi et al. (2009) per l'analisi di sedimenti marini, ma si è osservato lo sviluppo di una reazione di effervescenza (probabilmente dovuta alla liberazione di CO_2) che ha compromesso la fase estrattiva. Visto il successo ottenuto nell'analisi del materiale certificato di sedimenti ERM-CC580 (sedimento di estuario), si ritiene che il limite della metodica non sia verosimil-

mente legato al tipo di matrice, ma alla sensibilità analitica, non sufficiente per determinare le basse concentrazioni di MeHg solitamente presenti nei sedimenti d'acqua dolce. Mediante il metodo in GC-MS, invece, il MeHg è stato determinato con successo in entrambi i campioni di sedimento lacustre, con un CV massimo del 13,1 %.

In base ai dati disponibili, è possibile effettuare una comparazione preliminare tra i due metodi, considerando sia i materiali certificati che i campioni naturali analizzati ($n = 9$) (Tabelle 2 e 4). Il coefficiente di correlazione t di Kendall risulta pari a 0,986 ($p < 0,001$). Considerando il metodo con AMA 254 come variabile indipendente (in quanto assimilabile al protocollo già validato di Calderón et al., 2013), i due set di dati mostrano un buon accordo (Figura 5): calcolando la regressione non parametrica di Passing-Bablok (Vidali et al., 2016), gli intervalli di confidenza dell'intercetta comprendono il valore 0, mostrando così l'assenza di errori sistematici costanti, mentre la pendenza della retta risulta leggermente superiore a 1 (anche se il limite inferiore dell'intervallo di confidenza è 1,03), indicando così una lieve disproporzione tra i due metodi. In particolare, i valori determinati in GC-MS risultano leggermente più alti rispetto a quelli rilevati con AMA 254, e questa differenza sembra aumentare al crescere dei valori di concentrazione: questo risultato è coerente con i recuperi tendenzialmente maggiori ottenuti con GC-MS. Un numero maggiore di dati sarebbe tuttavia necessario per una comparazione accurata tra i due metodi.

7.4 Termine del test

Alla fine delle 96h verranno contati gli individui morti. Saranno considerati morti tutti gli organismi che non mostreranno alcun movimento anche dopo una leggera stimolazione e gli individui che non si ritrovano più nel beaker. Inoltre alla fine del test sarà opportuno misurare i valori di salinità, temperatura e pH.

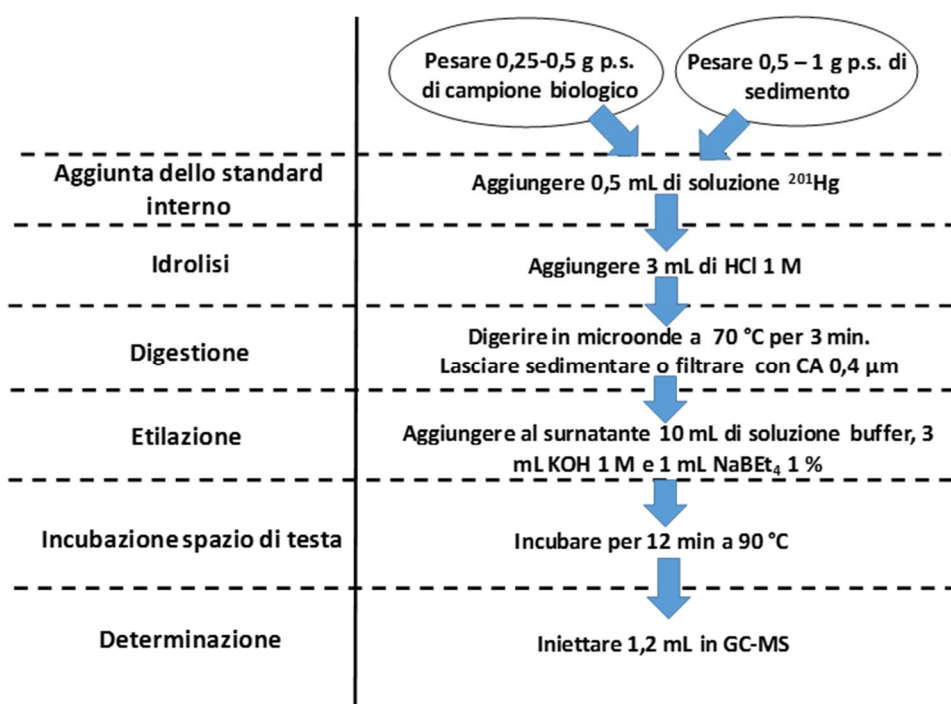


Figura 3. Procedura per la determinazione del MeHg mediante GC-MS.

CONCLUSIONI

La determinazione di MeHg ha importanti implicazioni per gli studi ambientali riguardanti le dinamiche del mercurio e la biodisponibilità, nonché per l'analisi di organismi acquatici destinati al consumo umano. I due metodi descritti sfruttano diverse proprietà chimico-fisiche del MeHg per ottenere l'estrazione e la determinazione di questo composto. Entrambi i protocolli permettono di ottenere buoni recuperi e CV. In particolare, sui

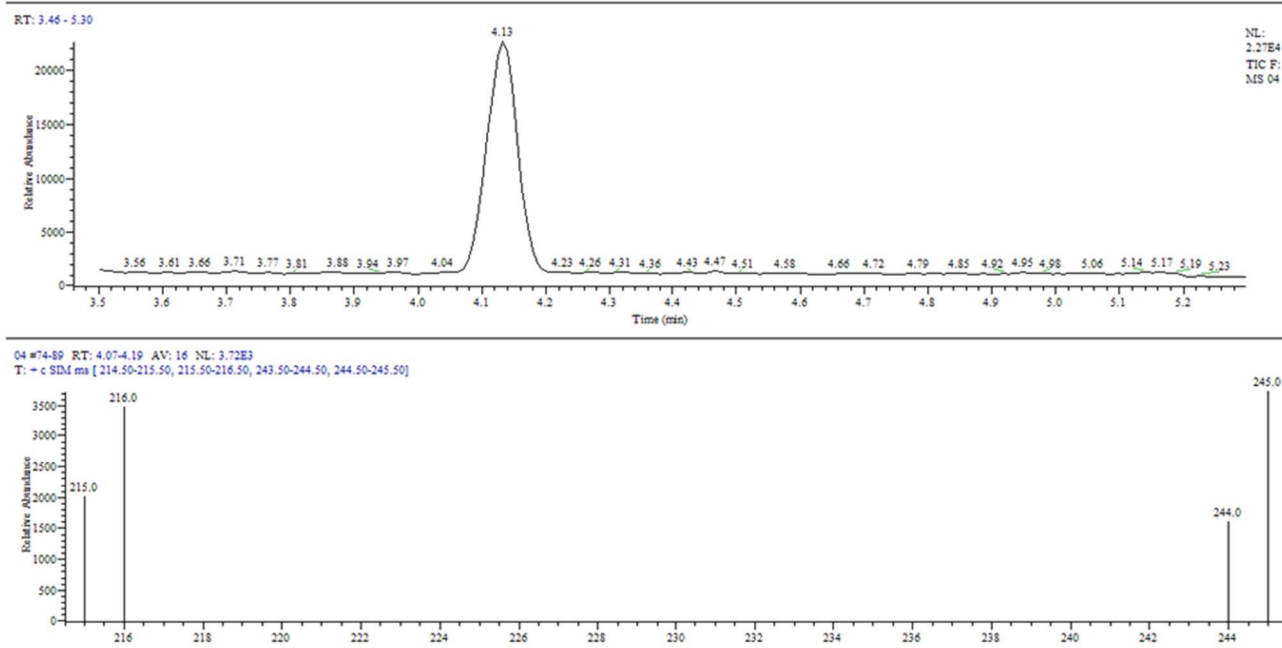


Figura 4. Cromatogramma di uno standard di MeHg²⁰¹MeHg (valore assoluto = 0,17 µg MeHg) mediante GC-MS e spazio di testa statico acquisito in SIM.

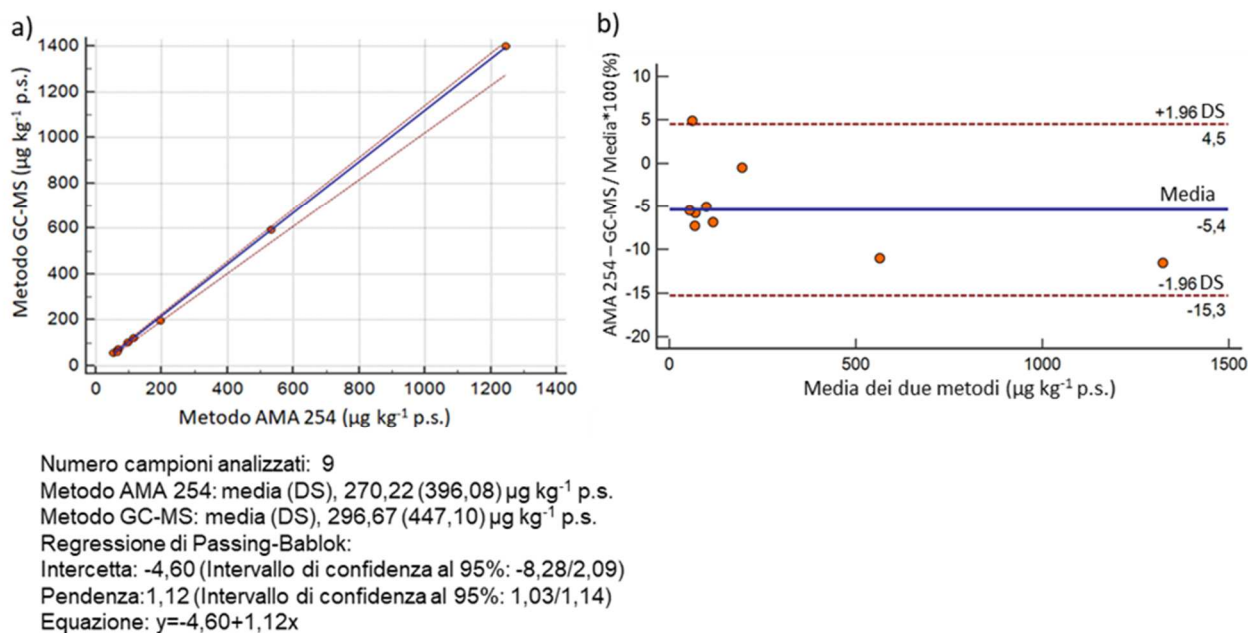


Figura 5. Comparazione tra i due metodi analitici: a) regressione non parametrica di Passing-Bablok tra i due set di dati; b) diagramma di dispersione di Bland-Altman

campioni naturali il CV risulta inferiore al 20 %. Il metodo con AMA 254 ha dimostrato una sensibilità inferiore rispetto a quello in GC-MS e, quindi, non è indicato per l'analisi del MeHg in campioni a concentrazioni molto basse, come i sedimenti d'acqua dolce. Entrambi i protocolli si sono dimostrati comunque adatti all'analisi del MeHg in matrici ambientali complesse.

BIBLIOGRAFIA

AGAH H., LEERMAKERS M., ELSKENS M., FATEMI S.M.R., BAEYENS W. (2007): "Total Mercury and Methyl Mercury Concentrations in Fish from the Persian Gulf and the Caspian Sea", *Water Air Soil Pollut.*, 181, 95-105.

ALFONSO C., LOURENÇO H.M., PEREIRA C., MARTINS M.F., CARVALHO M.L., CASTRO M., NUNES M.L. (2008): "Total and organic mercury, selenium and α -tocopherol in some deep-water fish species", *Sci. Food Agric.*, 88, 2543-2550.

- AZEMARD S., VASSILEVA E. (2015): "Determination of methylmercury in marine biota samples with advanced mercury analyzer: Method validation", *Food Chem.*, 176, 367-375.
- CALDERÓN J., GONÇALVES S., CORDEIRO F., DE LA CALLE B. (2013): "Determination of methylmercury in seafood by direct mercury analysis: standard operating procedure. JRC technical reports", Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Belgium.
- CARBONELL G., BRAVO J.C., FERNÁNDEZ C., TARAZONA J.V. (2009): "A New Method for Total Mercury and Methyl Mercury Analysis in Muscle of Seawater Fish", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 83, 210-213.
- CARICCHIA A.M., MINERVINI G., SOLDATI P., CHIAVARRINI S., UBALDI C., MORABITO R. (1997): "GC-ECD determination of methylmercury in sediment samples using a spb-608 capillary column after alkaline digestion", *Microchem. J.*, 55, 44-55.
- CARRASCO L., DIEZ S., BASINONA J.M. (2009): "Simultaneous determination of methyl- and ethylmercury by solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection", *J. Chromatogr. A*, 1216, 8828-8834.
- CARRASCO L., VASSILEVA E. (2015): "Determination of methylmercury in marine sediment samples: method validation and occurrence data", *Anal. Chim. Acta.*, 853, 167-178.
- CARRASCO L., DIEZ S., BASINONA J.M. (2007): "Methylmercury determination in biota by solid-phase microextraction: matrix effect evaluation", *J. Chromatogr. A*, 1216, 8828-8834.
- CASTELLE, S., SCHÄFER, J. G. BLANC, AUDRY S., ETCHEBER H., LISSALDE J-P. (2007): "50-year record and solid state speciation of mercury in natural and contaminated reservoir sediment", *Applied Geochemistry*, 22, 1359-1370.
- CHEN S.S., CHOU S.S., HWANG D.F. (2004): "Determination of methyl- and inorganic mercury in fish using focused microwave digestion followed by Cu++ addition, sodium tetraethylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography-mass spectrometry", *JFDA*, 12, 2, 175-182.
- CORDEIRO F., GONÇALVES S., CALDERÓN J., ROBOUCH P., EMTEBORG H., CONNEELY P., TUMBATSHILUMBA M-F., KORTSEN B., DE LA CALLE B. (2013.): "Determination of Methylmercury in Seafood A Collaborative Trial Report", JRC Technical Research series.
- FERNANDEZ R.G., BAYON M., GARCIA ALONSO J. L., SANZ-MEDEL A. (2000): "Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry", *J. Mass Spectrom.*, 35, 639-646.
- GUZZELLA L.M., NOVATI S., CASATTA N., ROSCIOLI C., VALSECCHI L., BINELLI A., PAROLINI M., SOLCÀ N., BETTINETTI R., MANCA M., MAZZONI M., PISCIA R., VOLTA P., MARCHETTO A., LAMI A., MARZIALI L. (2018): "Spatial and temporal trends of target organic and inorganic micropollutants in Lake Maggiore and Lake Lugano (Italian-Swiss water bodies): contamination in sediments and biota", *Hydrobiologia*, 824, 271-290.
- HAJEB P., JINAP S., ABU BAKAR F., BAKAR J. (2009): "Optimizing conditions for methylmercury extraction from fish samples for GC analysis using response surface methodology", *Food Addit. Contam. Part A*, 26, 829-838.
- HINTELMANN H., NGUYEN H.T. (2005): "Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching", *Anal. Bioanal. Chimica*, 381, 360-365.
- JAGTAP R., KRIKOWA F., MAHER W., FOSTER S., ELLWOOD M. (2011): "Measurement of methyl mercury (I) and mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLCICPMS and HPLC-HGAAS", *Talanta*, 85, 49-55.
- JIMENEZ M.S., STURGEON R.E. (1997): "Speciation of methyl- and inorganic mercury in biological tissues using ethylation and gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometric detection", *J. Anal. At. Spectrom.*, 12, 597-601.
- LAMBERTSSON L., NILSSON M. (2006): "Organic Material: The Primary Control on Mercury Methylation and Ambient Methyl Mercury Concentrations in Estuarine Sediments", *Environ. Sci. Technol.*, 40, 6, 1822-1829.
- LIANG L., HORVAT M., BLOOM N.S. (1994): "An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection", *Talanta*, 41, 371-379.
- LIANG L., HORVAT M., CERNICHIARI E., GELEIN B., BALOGH S. (1996): "Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry", *Talanta*, 43, 1883-1888.
- MAGGI, C., BERDUCCI, M. T., BIANCHI, J., GIANI, M., AND CAMPANELLA, L. (2009): "Methylmercury determination in marine sediment and organisms by DirectMercury Analyser", *Anal. Chim. Acta*, 641, 32-36.
- MARZIALI L., VALSECCHI L. (2017): "Diffusive Gradients in Thin-films (DGT) per la valutazione della frazione labile di mercurio in sedimenti e acque di fiumi e laghi", *Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News.*, 1, 2-14.
- MARZIALI L., ROSIGNOLI F., DRAGO A., PASCARIELLO S., VALSECCHI L., ROSSARO B., GUZZELLA L. (2017): "Toxicity risk assessment of mercury, DDT and arsenic legacy pollution in sediments: A triad approach

under low concentration conditions”, *Sci. Total Environ.*, 593–594, 809–821.

PISANELLO F., MARZIALI L., ROSIGNOLI F., POMA G., ROSCIOLI C., POZZONI F., GUZZELLA L. (2016): “In situ bioavailability of DDT and Hg in sediments of the Toce River (Lake Maggiore basin, Northern Italy): accumulation in benthic invertebrates and passive samplers”, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23, 10542-10555.

RAZAVI, N., RIDAL J., WIT W., HICKEY. M., CAMPBELL L., HODSON P. (2013): “Ebullition rates and mercury concentrations in St. Lawrence River sediments and a benthic invertebrate”, *Environ Toxicol Chem.*, 32, 857-65.

RIVA-MURRAY K., CHASAR L.C., BRADLEY P.M., BURNS D., BRIGHAM M.E., SMITH M.J., ABRAHAMSEN T. (2011): “Spatial patterns of mercury in macroinvertebrates and fishes from streams of two contrasting forested landscapes in the eastern United States”, *Ecotoxicology*, 20, 1530-1542.

SILVA DA ROCHA M., SOLDADO A.B., BLANCOA E., SANZ-MEDEL A. (2001): “Speciation of mercury using capillary electrophoresis coupled to volatile species generation-inductively coupled plasma mass spectrometry”, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 951-956.

SQUADRONE S., CHIARAVALLE E., GAVINELLI S., MONACO G., RIZZI M., ABETE, M.C. (2015): “Analysis of mercury and methylmercury concentrations, and selenium: mercury molar ratios for a toxicological assessment of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in the most recent stranding event along the Adriatic coast (Southern Italy, Mediterranean Sea)”, *Chemosphere*, 138, 633-641.

ULLRICH S.M., TANTON T.W., ABDRAHITOVA S.A. (2001): “Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation”, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 31, 241-293.

VIDALI M., TRONCHIN M., DITTADI R. (2016): “Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio”, *Biochimica clinica*, 40,129-142.

WATANABE T., KIKUCHI H., MATSUDA R., HAYASHI T., AKAKI K., TESCHIMA R. (2015): “Performance Evaluation of an Improved GC-MS Method to Quantify Methylmercury in Fish”, *Food Hyg. Saf. Sci.*, 56,69-76.

Caratterizzazione di un refluo civile per la determinazione delle variabili di INPUT del modello ASM1

a cura di

Daniele Montecchio (*), Camilla M. Braguglia, Agata Gallipoli, Andrea Gianico, Pamela Pagliaccia. CNR - Istituto di Ricerca sulle Acque, Roma

Gianni Andreottola. Università degli Studi di Trento, DiCAM, Trento

RIASSUNTO

La modellizzazione matematica degli impianti di trattamento delle acque reflue civili presenta grandi potenzialità in termini di ottimizzazione dei processi, sia al fine della riduzione dei costi che dell'individuazione degli aspetti critici di una determinata configurazione impiantistica. Tuttavia questo strumento fatica ad imporsi presso i gestori, per via della apparente complessità di utilizzo dei modelli, a partire da quello maggiormente diffuso: l'ASM1 (Activated Sludge Model n° 1).

L'aspetto più delicato consiste nella determinazione delle variabili richieste dal modello che, notoriamente, non coincidono con i parametri biochimici comunemente rilevati per valutare il funzionamento di un impianto. Per ovviare a questa apparente complessità, il presente articolo descrive una procedura per individuare le variabili di input del modello mediante una serie di parametri comunemente utilizzati (BOD, COD, TKN, N ammoniacale, ecc.) ed una prova respirometrica.

SUMMARY

Mathematical modelling of civil WWTPs has a great potential in regard to process optimizations, both in terms of cost reduction and detection of the critical aspects of the treatment plant configuration. Nevertheless, this tool has still limited application, owing to the apparent complexity of the models, including the widespread ASM1 (Activated Sludge Model n° 1).

The most critical aspect is the model variables determination, which is not straightforward, since they do not correspond to the commonly detected biochemical parameters of a WWTP. To overcome this issue, this work describes a procedure aiming at deriving the ASM1 input variables through the determination of biochemical parameters (BOD, COD, TKN, ammoniacal N and so forth) and the execution of a respirometric test.

1. INTRODUZIONE

Il modello più utilizzato per i processi a fanghi attivi dei reflui civili è costituito ancora oggi dall'ASM1 (Activated Sludge Model n° 1), pubblicato dall'IAWPRC nel 1987. Nonostante negli anni successivi vi sia stata una significativa evoluzione di questo modello, che ha portato al rilascio di versioni più complete (ASM2 che incorpora il ciclo del fosforo e ASM3 che descrive con accuratezza i processi di decadimento cellulare), in virtù della sua semplicità di applicazione, che raramente va a discapito dell'accuratezza, l'ASM1 rimane il modello più diffuso nelle applicazioni su scala reale. Pur nella sua semplicità, uno degli aspetti che ne limita l'utilizzo è costituito dalla quantità di dati richiesti, come avviene per la maggior parte dei modelli matematici; in particolare, può risultare difficile la determinazione delle variabili del modello a partire dai dati classici utilizzati negli impianti di depurazione (BOD, COD, TKN, TSS, ecc.).

Alcune piattaforme di sviluppo contengono schemi per il frazionamento del COD e dei composti azotati, finalizzati alla creazione dell'INPUT del modello. I coefficienti di frazionamento di default, tuttavia, non sempre sono adatti ai casi reali e la loro applicazione acritica può portare ad errori anche grossolani che

inficiano pesantemente i risultati della modellizzazione.

Di seguito viene proposto un approccio per il frazionamento del COD e dei composti azotati, relativo ad un refluo civile, finalizzato alla creazione del set di variabili di INPUT richieste dal modello ASM1.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura descritta è riferibile essenzialmente ad un refluo civile tradizionale. Poiché le ipotesi su cui è basata non sono necessariamente applicabili ad altri reflui biologici, l'estensione di questa procedura ad altri reflui deve essere attentamente valutata e può anche comportarne significative modifiche.

3. DESCRIZIONE DEL MODELLO ASM1

Il modello ASM1 descrive 8 processi biologici che coinvolgono 13 variabili (organiche e inorganiche).

Le variabili sono divise nelle componenti carboniose organiche, espresse in concentrazioni di COD, componenti carboniose inorganiche (alcalinità), espressa in concentrazione molare, e componenti azotate, espresse in concentrazioni di N. Le variabili sono riportate in Tab. 1.

* montecchio@irsa.cnr.it

Tabella 1. Variabili del modello ASM1.

Componenti carboniose	
Variabili	Descrizione
S _s	COD solubile biodegradabile
S _i	COD solubile inerte
S _o	Ossigeno
X _s	COD particolato biodegradabile ovvero COD lentamente biodegradabile
X _i	COD particolato inerte
X _{BH}	Biomassa eterotrofa
X _{BA}	Biomassa autotrofa
X _P	Biomassa decaduta (inerte)
Componenti azotate	
Variabili	Descrizione
S _{NO}	NO _x totali
S _{NH}	N ammoniacale
S _{ND}	N organico solubile biodegradabile
X _{ND}	N organico particolato biodegradabile
Componenti inorganiche	
Variabili	Descrizione
S _{ALK}	Alcalinità

I processi biologici descritti dal modello sono i seguenti:

1. Crescita aerobica dei batteri eterotrofi (ossidazione della sostanza organica usando O₂ come accettore di elettroni).
2. Crescita anossica dei batteri eterotrofi (ossidazione della sostanza organica usando NO_x come accettore di elettroni).
3. Crescita aerobica dei batteri autotrofi (ossidazione di N ammoniacale usando O₂ come accettore di elettroni).
4. Decadimento dei batteri eterotrofi.
5. Decadimento dei batteri autotrofi.
6. Ammonificazione di N organico solubile.
7. Idrolisi del COD particolato biodegradabile.
8. Idrolisi di N organico biodegradabile particolato.

Per un approfondimento del modello e della matrice di Petersen si rimanda a Henze et al. (1987) ed al seguente link:

<http://www.it.uu.se/edu/course/homepage/h2orentek/WWT98/asm1-2004.pdf>

4. PROCEDURA PER LA CARATTERIZZAZIONE DELL'INFLUENTE

4.1 Componenti carboniose organiche

Le variabili più complesse da individuare, che creano

Tabella 2. Nomenclatura

Simbolo	Descrizione	U.M.
COD _{tot}	COD totale	[mgCOD L ⁻¹]
COD _{sol}	COD solubile	[mgCOD L ⁻¹]
COD _p	COD particolato	[mgCOD L ⁻¹]
COD _{bio}	COD biodegradabile totale	[mgCOD L ⁻¹]
f _d	Frazione di X _P generato dal consumo di COD _{bio}	-
COD _{bio_p}	COD biodegradabile particolato	[mgCOD L ⁻¹]
N _{tot}	N totale	[mgN L ⁻¹]
N _{org}	N organico	[mgN L ⁻¹]
N _{org_p}	N organico particolato	[mgN L ⁻¹]
N _{biomass}	N presente nella biomassa microbica	[mgN L ⁻¹]
N _{chem_bound}	N legato alla sostanza organica	[mgN L ⁻¹]
N _{chem_bound_sol}	N legato alla sostanza organica solubile	[mgN L ⁻¹]
N _{chem_bound_p}	N legato alla sostanza organica particolata	[mgN L ⁻¹]

maggiori problemi a chi si approccia a questo modello, sono le componenti carboniose organiche. Queste infatti sono variabili aggregate, costituite cioè da una molteplicità indefinita di molecole, e non esiste una metodologia analitica che possa distinguere ad esempio un componente biodegradabile da uno inerte (cioè non attaccabile dai batteri presenti nel sistema).

Per individuare le componenti organiche biodegradabili si ricorre a misure indirette del consumo di ossigeno, determinando così il consumo biologico di ossigeno (BOD). Tra le tante pubblicazioni riportate in letteratura, si segnalano quelle di APAT-IRSA (2004), relativa alla determinazione del BOD, e quelle di Andreottola et al. (2001) e Ziglio et al. (2001), che descrive l'esecuzione di test respirometrici. I simboli introdotti nel presente documento sono descritti in Tab. 2; gli altri simboli sono mutuati dal modello ASM1 per il quale si rimanda a Henze et al. (1987) ed al seguente link:

<http://www.it.uu.se/edu/course/homepage/h2orentek/WWT98/asm1-2004.pdf>

La procedura illustrata nel presente articolo, finalizzata al frazionamento del COD dell'influente, è basata sull'esecuzione di tali test ed è costituita dai passaggi descritti di seguito

4.1.1 Determinazione del COD particolato e solubile

Il primo passaggio consiste nella determinazione del COD totale (COD_{tot}) e solubile (COD_{sol}). Il COD particolato (COD_p) si calcola per differenza (eq. 1):

$$\text{COD}_p = \text{COD}_{\text{tot}} - \text{COD}_{\text{sol}} \quad \text{Eq. (1)}$$

E' utile evidenziare che il COD particolato comprende le variabili X_S , X_I , X_{BH} , X_{BA} , X_P mentre il COD solubile comprende le variabili S_S e S_I , come riportato nelle eq. 2-3:

$$COD_p = X_S + X_I + X_{BH} + X_{BA} + X_P \quad \text{Eq. (2)}$$

$$COD_{sol} = S_S + S_I \quad \text{Eq. (3)}$$

4.1.2 Determinazione del COD totale biodegradabile

Il COD biodegradabile totale (COD_{bio}) è costituito dai composti X_S , X_{BH} , X_{BA} , S_S , come riportato in eq. 4:

$$COD_{bio} = X_S + X_{BH} + X_{BA} + S_S \quad \text{Eq. (4)}$$

Il COD_{bio} si determina a partire dal BOD totale del substrato, utilizzato mediante la procedura illustrata da APAT-IRSA (2004). Poiché il valore del COD_{bio} include la concentrazione dei microrganismi, per quantificarlo è fondamentale calcolare il valore del BOD_∞ mediante la procedura descritta da Andreottola et al. (2005). Infatti né il BOD_{20} né tantomeno il BOD_5 sono sufficienti per considerare la respirazione endogena dei batteri.

Per come è costruito l'ASM1, che assume che una frazione della biomassa morta nei processi 4 e 5 si trasformi in una componente inerte (X_P), il BOD_∞ non è adatto a rappresentare il COD totale biodegradabile, poiché X_P non contribuisce al consumo di ossigeno. Pertanto occorre contemplare tale frazione nella stima del COD totale biodegradabile, come riportato

$$COD_{bio} = \frac{BOD_\infty}{(1 - f_d)} \quad \text{Eq. (5)}$$

nell'eq. 5:

ove f_d rappresenta la frazione di COD inerte generato dal consumo di un'unità di COD_{bio} . In letteratura tale coefficiente è riportato nell'intervallo compreso tra 0.1 – 0.2; in Allegato 1 questa frazione è calcolata a partire dai coefficienti di default del ASM1 e corrisponde circa a 0.14, valore pressoché coincidente con quello suggerito da Andreottola et al. (2005).

In un influente di tipo civile, si può assumere che la concentrazione di biomassa autotrofa sia trascurabile e pertanto il termine X_{BA} può essere eliminato dall'eq. 4.

4.1.3 Determinazione del COD solubile biodegradabile

La determinazione del COD solubile biodegradabile (S_S) costituisce probabilmente la fase più delicata del frazionamento del COD. La procedura prevede in primo luogo la filtrazione del refluo con passante corrispondente a 0,45 μm per determinare il COD_{sol} ; successivamente si deve calcolare la frazione biodegradabile (S_S) per distinguerla da quella inerte (S_I). Poiché durante la filtrazione la biomassa microbica viene rimossa, per determinare la frazione biodegradabile è necessario inoculare nuova biomassa per poi effettuare una prova respirometrica, seguendo la procedura descritta da Andreottola et al. (2001). Nella prova respirometrica il substrato è costituito dal refluo filtra-

to, che consiste unicamente nel COD_{sol} , mentre come inoculo si utilizza un campione di fango attivo prelevato dalla vasca di ossidazione dell'impianto di depurazione.

In una prova respirometrica tradizionale il rapporto substrato/inoculo è di circa 1:20 in termini di COD. Il valore del COD_{sol} (che nel substrato coincide con il COD totale) di un refluo civile equivale al massimo a qualche centinaio di $mg L^{-1}$ (intervallo tipico: 150 – 500 $mg L^{-1}$) mentre la concentrazione di COD nella vasca di ossidazione equivale tipicamente a qualche grammo L^{-1} (intervallo tipico: 2000 – 5000 $mg L^{-1}$). Se i valori misurati sono questi, il rapporto volumetrico substrato/inoculo può essere 1:10 oppure 1:20. Si ricorda la necessità di aggiungere N-Aliltiurea in concentrazioni comprese tra 10 e 20 $mg L^{-1}$ per bloccare l'attività dei batteri nitrificanti (X_{BA}), in quanto consumano O_2 interferendo con la misura.

Dal punto di vista modellistico, l'interpretazione dei risultati della prova respirometrica deve tener conto delle peculiarità sia del substrato che dell'inoculo. Mentre il primo contiene soltanto le variabili S_S ed S_I , nell'inoculo sono presenti tutte le frazioni del COD considerate nell'ASM1; tuttavia, se l'impianto funziona correttamente, le componenti solubili (S_S ed S_I) ed X_S sono solitamente molto basse e possono essere trascurate. Di conseguenza il COD_p (che di fatto coincide con il COD totale) è costituito prevalentemente da batteri eterotrofi e biomassa morta (inerte per il modello) (X_P), che è considerata inerte nell'ASM1. La descrizione della composizione caratteristica di un inoculo prelevato dalla vasca di ossidazione è riportata in Allegato 2, e può essere facilmente ricavata effettuando una modellazione di un qualsiasi impianto correttamente funzionante.

Rispetto ad una respirometria tradizionale, l'assenza di COD lentamente biodegradabile (X_S) elimina (pressoché totalmente) la fase intermedia di consumo di O_2 ; di conseguenza la curva del consumo di O_2 avrà solamente 2 pendenze, la prima delle quali dovuta al consumo di S_S presente nel refluo (processo 1) e la seconda dovuta alla respirazione endogena, che nel modello è costituita dal consumo di S_S originato dal decadimento dei batteri X_{BH} e dalla successiva idrolisi di X_S (processi 4 e 7, rispettivamente).

In Fig. 1 è riportata la simulazione di una prova respirometrica effettuata sulla frazione solubile di un refluo di un depuratore di 7.000 a.e. (HRT = 8 ore ed età del fango = 15 giorni), utilizzando come inoculo un campione di fango attivo prelevato dalla vasca di ossidazione; il modello è stato modificato eliminando il processo di nitrificazione (processo 3).

Come si può vedere, il consumo di O_2 nella prima parte della prova è dovuto pressoché esclusivamente all'ossidazione di S_S ; infatti, venendo a mancare la frazione lentamente biodegradabile, la curva di consumo di O_2 presenta due sole pendenze (Fig. 1a, curva blu), dovute rispettivamente all'ossidazione di S_S ed alla respirazione endogena. Il contributo di quest'ultima può essere trascurato nella parte iniziale della prova, come evidenzia la curva rossa di Fig. 1a, che descrive il consumo simulato di O_2 in assenza di respirazione endogena, che nella fase iniziale coincide con il consumo totale di O_2 . Pertanto, il consumo

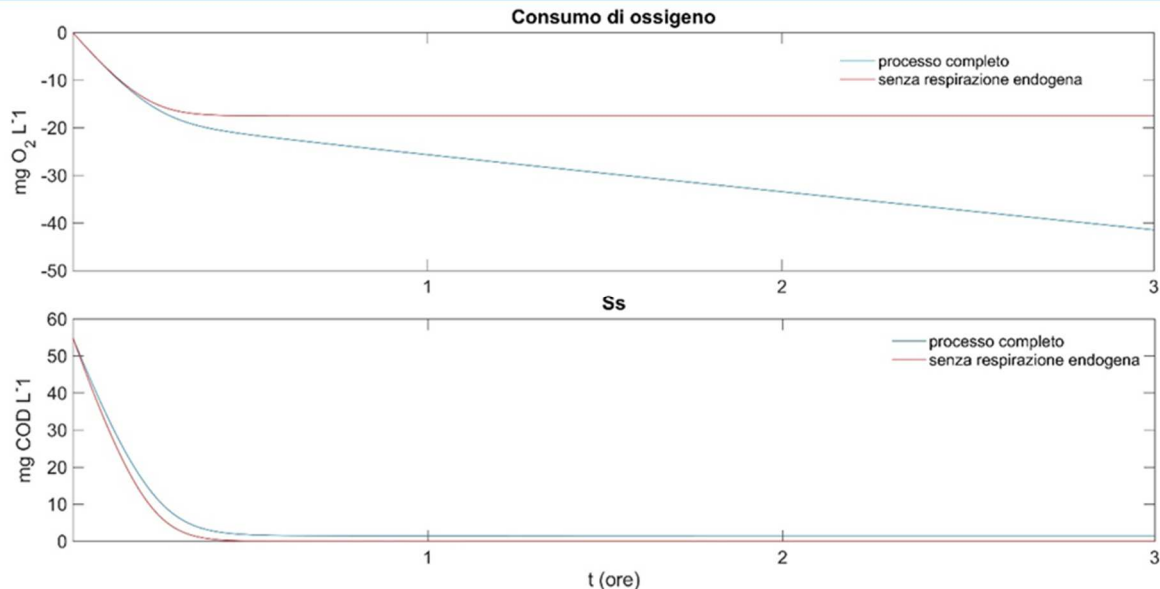


Figura 1. Simulazione del consumo di O_2 (Fig. 1a) e del COD solubile biodegradabile (Fig. 1b) durante una prova respirometrica.

di O_2 misurato fino al cambiamento di pendenza della retta è totalmente attribuibile all'ossidazione di S_s , come confermato dalla Fig. 1b. E' utile evidenziare che la seconda parte della curva blu che rappresenta la concentrazione di S_s è dovuta al contributo dei processi 4 e 7 del modello (respirazione endogena). In assenza di tale processi S_s verrebbe completamente consumato già nella fase iniziale del test (Fig. 1b, curva rossa).

Dal punto di vista modellistico, il valore di S_s si calcola mediante l'eq. 6, derivata dal processo 1 dell'ASM1:

$$S_s = \frac{O_2 \text{ consumato}}{(1-Y_H)} \quad \text{Eq. (6)}$$

Il valore di S_i si ricava per differenza dal COD_{sol} , a partire dall'eq. 3. Una prima verifica di congruità può essere effettuata confrontando il valore di S_i così calcolato con il COD_{sol} dell'inoculo; infatti, se la vasca di ossidazione funziona correttamente, quasi tutto il COD_{sol} sarà costituito dalla componente S_i che, per definizione, non viene interessata da processi biochimici e quindi rimane inalterata in ogni unità dell'impianto ed avrà pertanto lo stesso valore sia nel substrato che nell'inoculo. Pertanto il valore di S_i del substrato dovrà essere leggermente superiore a quella di COD_{sol} dell'inoculo.

4.1.4 Frazionamento del COD particolato

Una volta determinato il valore di S_s , il calcolo del COD biodegradabile particolato (COD_{bio_p}) si ricava sottraendo dal valore di COD_{bio} il valore di S_s . Il COD_{bio_p} è costituito dalle componenti biodegradabili riportate in eq. 7.

$$COD_{bio_p} = X_S + X_{BH} + X_{BA} \quad \text{Eq. (7)}$$

Se nel refluo non sono presenti NO_x , come generalmente accade, si può considerare che i batteri autotrofi siano assenti e quindi il valore X_{BA} può essere posto pari a 0. Risulta più difficile determinare il valo-

re di X_{BH} , che in prima approssimazione può essere stimato nel 10% del COD_{bio_p} ; il rimanente 90% sarà quindi costituito da X_S . Questo approccio, del tutto empirico, è sulla falsariga di quanto riportato nelle piattaforme commerciali, che legano X_{BH} ad una frazione del COD particolato (totale o biodegradabile) mediante un coefficiente di circa il 10%. In via del tutto astratta, si potrebbe condurre una prova respirometrica sul campione tal quale, senza aggiungere inoculo, e determinare il COD totale dato dalla respirazione endogena (che deve essere portata a compimento con notevole estensione della durata del test), ricordandosi di applicare l'eq. 5 per determinare X_{BH} . Tale procedura risulta tuttavia inutilmente complessa, può essere inficiata dalla bassa quantità di batteri eterotrofi nel refluo ed è pertanto sconsigliabile.

Nel refluo si può considerare che il residuo della biomassa decaduta X_P sia pari a 0 e pertanto il COD particolato è interamente costituito da X_i , che si può calcolare mediante l'eq. 8:

$$X_i = COD_p - COD_{bio_p} \quad \text{Eq. (8)}$$

4.2 Componenti azotate

La determinazione dei composti azotati viene effettuata con le tradizionali tecniche analitiche (APHA, 1998), per quanto riguarda N totale (N_{tot}), N ammoniacale (S_{NH}), ossidi di N (S_{NO}) e TKN. La misurazione di N_{tot} e TKN possono essere considerate una alternativa all'altra. L'azoto organico (N_{org}) viene calcolato per differenza, usando una delle equazioni a scelta tra eq. 9 ed eq. 10, e può essere determinato sia sul totale che sulla frazione solubile (N_{org} particolato viene calcolato per differenza).

$$N_{org} = TKN - S_{NH} \quad \text{Eq. (9)}$$

$$N_{org} = N_{tot} - S_{NO} - S_{NH} \quad \text{Eq. (10)}$$

N_{org} si divide tra N presente nella biomassa microbica ($N_{biomass}$), il cui coefficiente stechiometrico i_{XB} equivale a 0,086 gN g⁻¹COD, ed N legato alla sostanza organi-

ca ($N_{\text{chem_bound}}$), sia biodegradabile (dato dalla somma di S_{ND} e X_{ND}) che inerte. Poiché N_{biomass} è legato alla sola frazione particolata, $N_{\text{chem_bound_sol}}$ coincide con N_{org} in fase solubile. N_{biomass} ed $N_{\text{chem_bound_p}}$ si calcolano mediante le eq. 11 e 12:

$$N_{\text{biomass}} = i_{\text{XB}} \cdot (X_{\text{BH}} + X_{\text{BA}}) \quad \text{Eq. (11)}$$

$$N_{\text{chem_bound_p}} = N_{\text{org_p}} - N_{\text{biomass}} \quad \text{Eq. (12)}$$

La determinazione della frazione di $N_{\text{chem_bound}}$ legata al COD biodegradabile, non potendo essere effettuata per via analitica, viene effettuata allocando $N_{\text{chem_bound}}$ in misura proporzionale alla frazione di COD biodegradabile, sia per la parte solubile che per quella particolata. S_{ND} ed X_{ND} possono quindi essere calcolati mediante le eq. 13 e 14:

$$S_{\text{ND}} = (N_{\text{chem_bound_sol}}) \cdot \frac{S_s}{(S_s + S_i)} \quad \text{Eq. (13)}$$

$$X_{\text{ND}} = (N_{\text{chem_bound_p}}) \cdot \frac{X_s}{(X_s + X_i + X_p)} \quad \text{Eq. (14)}$$

La frazione di N_{org} legata al COD inerte non è inclusa nel modello, ma può essere determinata per differenza tra N_{org} totale e biodegradabile al fine di chiudere il bilancio di massa.

5. CREAZIONE DI UN INPUT DINAMICO

La procedura sopradescritta non può chiaramente essere ripetuta su base giornaliera, come in teoria è richiesto per una simulazione dinamica su più giorni. Per ovviare a ciò, è opportuno calcolare le concentrazioni unitarie, per ogni singola variabile, rispetto alla concentrazione di carico organico totale (espresso in termini di solidi volatili, SV, ovvero solidi totali, ST, ovvero COD), per le componenti organiche, ed a quella di carico azotato (N_{tot} oppure TKN), per le componenti azotate. Le concentrazioni unitarie si potranno quindi moltiplicare per i valori giornalieri dei carichi organici ed azotati.

BIBLIOGRAFIA

A general description of the Activated Sludge Model No. 1 (ASM1), Department of Information Technology, Uppsala Universitet. <http://www.it.uu.se/edu/course/homepage/h2orentek/WWT98/asm1-2004.pdf>

ANDREOTTOLA G., FOLADORI P., GELMINI A., ZIGLIO G. (2001). Respirometria applicata alla depurazione delle acque. Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale, Università di Trento.

ANDREOTTOLA G., FOLADORI P., ZIGLIO G. (2005) Dal monitoraggio convenzionale alla verifica avanzata dei processi a fanghi attivi. pp 300, ISBN 88-8443-117-4.

APAT-IRSA (2004), Metodi analitici per le acque, Volume 2, metodo 5120 - Richiesta biochimica di ossigeno (BOD5), pag. 767. <http://www.irsa.cnr.it/Docs/Capitoli/1000.pdf>

APHA, Federation WE. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998):2-2. doi: ISBN 9780875532356.

MATSUO T., WENTZEL M. C., MARAIS G. R. (1995). The Activated Sludge Model No. 2: biological phosphorus removal. Water Science and Technology 31 (2) 1-11.

GUJER W., HENZE M., MINO T., VAN LOOSDRECHT M. (1999). Activated Sludge Model No. 3. Water Science and Technology 39 (1), 183-193.

HENZE M., GRADY C. P. L., GUJER W., MARAIS G. R., T. MATSUO, (1987). Activated sludge model no. 1. Scientific and Technical Report No. 1, IAWPRC, London.

ZIGLIO G., ANDREOTTOLA G., FOLADORI P., RAGAZZI M. (2001) Experimental validation of a single-OUR method for wastewater RBCOD characterisation. Water Science and Technology 43 (11), 119-126.

Allegato 1**Calcolo della frazione di COD inerte generato dal processo**

La frazione (f_d) di COD inerte (X_p) generato dall'ossidazione per via biologica di una unità di sostanza organica biodegradabile, può essere calcolata come di seguito riportato. Il calcolo viene effettuato prendendo in considerazione i seguenti processi del modello:

1. Processo 1, in cui O_2 viene utilizzato come accettore di e^- per ossidare la sostanza organica velocemente biodegradabile (S_s), producendo biomassa eterotrofa (X_{BH}).
2. Processo 4, in cui la biomassa eterotrofa (X_{BH}) decade, generando sostanza organica lentamente biodegradabile (X_s) e biomassa morta (X_p).
3. Processo 7, in cui la sostanza organica lentamente biodegradabile (X_s) viene idrolizzata in sostanza organica velocemente biodegradabile (S_s).

Il processo biologico riprende quindi dal punto 1 e si ripete fino al consumo completo (in realtà asintotico) di S_s . In Tabella 1 sono riportati i coefficienti stechiometrici di formazione/consumo di un'unità di ossigeno nell'ambito dei processi sopracitati, utilizzando i valori di default del modello ASM1.

Il rapporto f_d tra X_p (prodotto) ed SS (consumato) risulta essere equivalente a $0,16/1,16 = 0,14$.

Tabella 1. Consumo e produzione dei composti organici.

	O_2	S_s	X_{BH}	X_s	X_p
Processo 1	-1	-3,03	2,03		
Processo 4			-2,03	1,86	0,16
Processo 7		1,86		-1,86	
Totale processi	-1	-1,16	0	0	0,16

Allegato 2**Composizione caratteristica del COD di un inoculo prelevato dalla vasca di ossidazione**

Nella vasca di areazione sono presenti tutte le frazioni di COD considerate nell'ASM1; la concentrazione di queste componenti non si può conoscere a priori, poiché dipende dalle caratteristiche del refluo influente, dalla configurazione impiantistica, dalle condizioni operative (HRT, età del fango, concentrazione di O_2 , ecc.). Tuttavia, una serie di considerazioni possono essere esposte per un impianto correttamente funzionante, avente le seguenti classiche caratteristiche:

- Configurazione classica basata sulla presenza di vasche di pre-denitrificazione e di areazione/nitrificazione,
- HRT della vasca di areazione sufficientemente lungo (ad esempio 6 - 8 ore)
- Età del fango di almeno alcuni giorni.

Nella vasca di aerazione avvengono tutti i processi contemplati dal modello, con l'eccezione della denitrificazione; in particolare, viene consumata la sostanza organica biodegradabile (S_s e X_s) e vengono prodotte le biomasse microbiche eterotrofe ed autotrofe. In funzione delle cinetiche tipiche dei processi, la frazione particolata del COD è solitamente così suddivisa:

- La parte di X_s contenuta nel refluo viene rapidamente idrolizzata (processo 7 nel modello), anche a partire dalla precedente vasca di denitrificazione; pertanto la sola frazione che si può trovare deriva dal decadimento dei batteri (processi 4 e 5). Essendo la cinetica di questi processi più lenta di quella di idrolisi, generalmente X_s non si accumula in vasca e la sua concentrazione risulta pressoché trascurabile;
- X_{BH} e X_{BA} raggiungono in questa vasca le maggiori concentrazioni, con la prima variabile che può arrivare anche a qualche $g\ L^{-1}$, mentre la seconda è generalmente molto più bassa (qualche decina/centinaia di $mg\ L^{-1}$).
- Per quanto riguarda gli inerti, X_I rimane costante in tutte le unità dell'impianto (ed è coincidente con la concentrazione nel refluo), mentre X_P raggiunge le massime concentrazioni (in quanto viene prodotta nei processi 4 e 5 senza mai essere consumata), che possono arrivare a qualche centinaia di $mg\ L^{-1}$.

Il COD_{sol} nella vasca di ossidazione è generalmente molto basso, essendo costituito da:

- S_i , che resta costante in tutte le sezioni dell'impianto: normalmente equivale a poche decine di $mg\ L^{-1}$.
- S_s derivante (quasi) unicamente dall'idrolisi della frazione di X_s generata dal decadimento cellulare di X_{BH} ed X_{BA} . Infatti, le componenti S_s ed X_s originariamente presenti del refluo, sono consumate molto rapidamente (già durante la pre-denitrificazione), e non si ritrovano nella vasca di ossidazione. Viceversa, i processi di decadimento cellulare sono molto più lenti rispetto al consumo di S_s (che è il processo più rapido del sistema), e quindi S_s non si accumula nella vasca e risulta quasi trascurabile.

Inoltre, per i suesposti motivi, il valore di COD_p generalmente è molto maggiore del COD_{sol} .



Il Progetto Parchi Verbano Ticino: verifica e sperimentazione di scenari di gestione sostenibili e condivisi

Il Progetto Parchi Verbano Ticino, finanziato nell'ambito del Programma di Cooperazione INTERREG V-A ITALIA-SVIZZERA 2014 - 2020 (Asse 2 - Obiettivo specifico 2.1 Aumento delle strategie comuni per la gestione sostenibile della risorsa idrica), mira, nell'arco di tre anni (2019-2022), alla definizione di strategie di gestione ambientale realizzabili, sostenibili, condivise ed esportabili in contesti analoghi dell'area alpina. L'area considerata è quella del Lago Maggiore e del Fiume Ticino emissario a valle della diga della Miorina. La diga, costruita tra il 1938 e il 1942, regola il livello dell'acqua nel lago per scopi industriali, agricoli e idroelettrici e per il contenimento delle inondazioni secondo delle condizioni meteorologiche. Questo sistema di acque rappresenta la principale risorsa idrica transfrontaliera della Regione Insubrica ed è caratterizzata dalla presenza di Aree Protette, Siti appartenenti alla Rete Natura 2000 e alla Rete Smeraldo (Svizzera) nei quali l'acqua è considerata elemento fondamentale per la conservazione di habitat e specie. L'obiettivo principale del progetto è quindi una gestione condivisa e sostenibile dei livelli del Lago Maggiore e della qualità dell'ambiente circostante, con particolare riferimento alle aree naturali protette.



Il capofila italiano del progetto è l'Ente di gestione delle aree protette del Ticino e del Lago Maggiore, il capofila Svizzero è la Fondazione Bolle di Magadino e i partner coinvolti sono l'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-IRSA), il Parco Lombardo della valle del Ticino, il Consorzio del Ticino, l'Università

degli Studi dell'Insubria, la Riserva Naturale Pian di Spagna e Lago di Mezzola. Questo progetto coinvolge anche gli enti derivatori delle acque del Fiume Ticino. Le modalità di gestione dei deflussi dal lago, sulle quali verte il progetto, hanno infatti effetti sulle portate rilasciate dal lago e di conseguenza sulla disponibilità idrica nel suo emissario. Saranno inoltre coinvolti gli enti amministrativi territorialmente interessati (province e Canton Ticino).

Il CNR-IRSA è impegnato in particolare in attività relative alla

- i) individuazione ed applicazione di indicatori dello stato di qualità dei litorali lacustri;
- ii) identificazione di nuovi indicatori degli effetti della gestione dei livelli su habitat di interesse comunitario tipici dei litorali lacustri;
- iii) analisi dello stato e trend della comunità di macro- e meio-fauna fluviali in funzione delle scelte gestionali;
- iv) raccolta ed elaborazione di dati idrologici e chimici;
- v) divulgazione del Progetto.

Per lo studio della meio-fauna, il CNR-IRSA si avvale delle competenze presenti nell'Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (CNR-IRET).

Le numerose attività in cui è articolato il progetto permetteranno di raccogliere dettagliate ed importanti informazioni sui rapporti esistenti tra la gestione dei livelli del lago e lo stato di salute degli ecosistemi lacustri e della porzione di fiume a valle del lago, nonché sugli interventi a supporto per una migliore gestione ambientale. L'efficacia di una governance ambientale consapevole presuppone che tutte queste informazioni siano tradotte in indicazioni semplici e sintetiche per gli stakehol-

News

ders, in primis per il Consorzio del Ticino, soggetto impegnato nella gestione dei livelli del lago. Il progetto quindi porterà alla definizione di strumenti condivisi per una gestione sostenibile che riduca i conflitti d'uso, con un effetto positivo concreto sui fruitori, sulla biodiversità e la salute degli ecosistemi.

La scelta delle stazioni di campionamento (Fig. 1) lungo le sponde del lago è basata sul loro significato come ecosistemi modello per definire al meglio i possibili impatti sulla qualità degli habitat e delle comunità biologiche. Queste sono distribuite nella parte settentrionale, centrale e meridionale del lago, in quanto soggette a variazioni di livello diverse nel periodo di regolazione (marzo e settembre) della diga della Miorina. In ogni stazione, il monitoraggio dello stato ecologico è condotto sia in siti soggetti ad asciutte durante il periodo di minimo invaso (a in Fig. 1), che in siti permanentemente bagnati (b). Come risultato finale, il progetto si propone di individuare uno schema gestionale modulato dei livelli delle acque del lago e delle portate del fiume condiviso tra gestori delle aree protette e gestori della risorsa idrica.

a cura di:

**Angela Boggero, Lyudmila Kamburska, Michela Rogora, Nicoletta Riccardi,
Dario Manca, Marzia Ciampittello**

CNR-IRSA Sede di Verbania

Tiziana Di Lorenzo

CNR-IRET Sede di Firenze

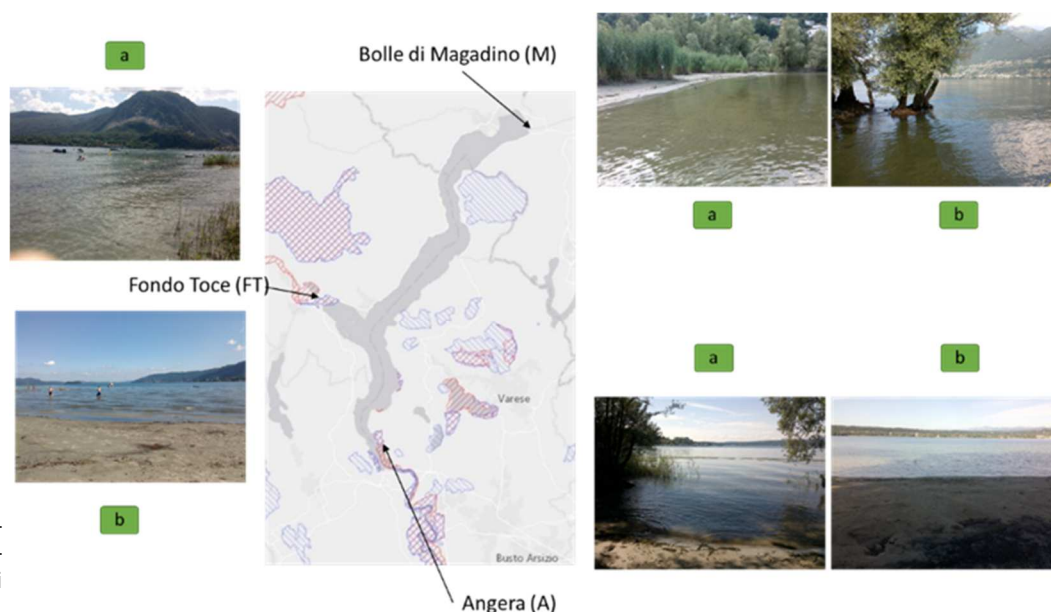


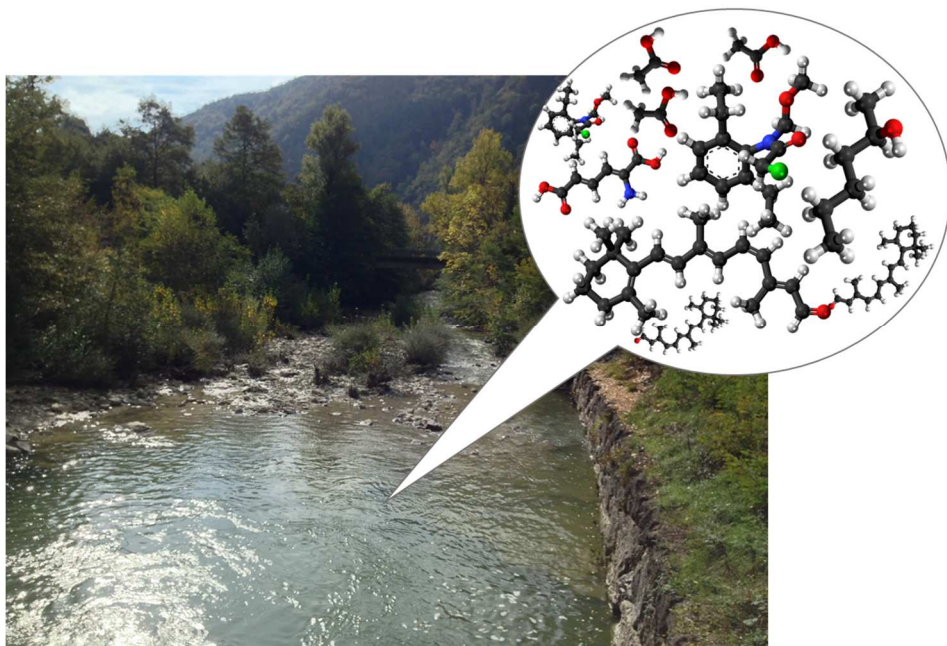
Figura 1.
Siti di campionamento in zone a protezione speciale (vedi testo per i dettagli).



Approccio metodologico per valutare le miscele di sostanze chimiche negli ecosistemi: un progetto in sinergia con il Ministero dell'Ambiente

Con lo sviluppo delle conoscenze relative all'inquinamento ambientale e dei suoi effetti sugli ecosistemi, sono state introdotte su scala nazionale ed europea diverse normative per garantire la tutela dell'ambiente e della salute umana attraverso un uso più sicuro delle sostanze chimiche.

Il Regolamento (CE) n.1907/2006, "Regolamento REACH", prevede che venga effettuata una valutazione preliminare dei rischi per l'uomo e per l'ambiente delle sostanze chimiche prima di una loro immissione sul mercato europeo. Tuttavia il sistema legislativo dell'Unione europea non prevede una valutazione integrata degli effetti combinati delle sostanze chimiche ma si basa sulla gestione del rischio di singoli contaminanti.



Per quanto riguarda l'attuale sistema legislativo Europeo per la tutela delle acque (WFD: Water Framework Directive, recepita in Italia con il D.Lgs 152/06), questo prevede il monitoraggio di sostanze prioritarie e prioritarie pericolose (tabella 1/A dell'allegato 1 alla parte terza del D.Lgs.152/06) e le concentrazioni misurate vengono confrontate con standard di qualità ambientali (EQS: Environmental Quality Standard) per la classificazione della qualità chimica del corpo idrico. Il rispetto dei valori soglia per le singole sostanze chimiche po-

trebbe tuttavia non essere sufficiente a garantire la salvaguardia degli ecosistemi acquatici e la tutela della salute umana. Infatti gli organismi viventi nella realtà sono esposti contemporaneamente a più sostanze (miscele). Queste ultime vengono definite come combinazione di due o più sostanze chimiche che, indipendentemente dalla loro origine spaziale o temporale, possono influenzare il livello di rischio a cui è soggetta una popolazione (EPA, 1986).

Nel 2012, la Commissione Europea ha pubblicato una comunicazione sugli effetti combinati delle sostanze chimiche (Communication from the Commission to the Council - the combination effects of chemicals. Chem. Mix. Com. 252 (final. Brussels), esprimendo preoccupazione sulle limitazioni della valutazione individuale dei composti e proponendo un percorso per garantire che i rischi associati alle miscele siano correttamente compresi e valutati. Dunque, gli EQS attualmente previsti dalla WFD sono un primo passo e i potenziali effetti combinati delle sostanze chimiche dovrebbero essere affrontati in modo sistematico. Questo è stato chiaramente evidenziato anche dal 7° Programma Generale di Azione per l'ambiente dell'Unione Europea adottato dal Consiglio e dal Parlamento Europeo

News

(Decisione 1386/2013/UE “Vivere bene entro i limiti del nostro pianeta”) nel quale uno degli obiettivi era quello di sviluppare una strategia dell'Unione per un ambiente non tossico, anche attraverso azioni volte a mettere a punto approcci normativi adeguati per limitare gli effetti combinati delle sostanze chimiche.

L'importanza della valutazione degli effetti combinati è stata ribadita anche dal Consiglio dei Ministri dell'ambiente europei nelle Conclusioni adottate il 26 giugno 2019 in cui la Commissione europea è stata invitata a presentare opzioni per introdurre nella normativa UE requisiti specifici al fine di garantire che gli effetti combinati delle sostanze e l'esposizione combinata dell'uomo e dell'ambiente alle miscele di sostanze siano affrontate in modo adeguato e coerente.

La Commissione europea si sta adoperando per identificare le miscele di sostanze che devono essere valutate in via prioritaria. Ha infatti promosso e finanziato una serie di progetti per affrontare il problema della definizione dei criteri di qualità per i sistemi acquatici relativi a miscele di composti chimici, tra questi il progetto PREDICT (Prediction and Assessment of the Aquatic Toxicity of Mixtures of Chemicals) ed il progetto BEAM (Bridging Effect Assessment of Mixtures to Ecosystem Situation and Regulation). Fra gli obiettivi di quest'ultimo c'è quello di individuare possibili scenari realistici di esposizione per le miscele di sostanze tossiche potenzialmente a contatto con gli organismi acquatici.

Il mondo scientifico sta esaminando le possibili modalità in base alle quali gruppi di sostanze chimiche, ai quali l'uomo e l'ambiente sono particolarmente esposti, possano essere sottoposti a una valutazione combinata del rischio. È infatti molto complesso testare tutte le miscele usando test sperimentali standardizzati. È necessario impiegare metodi di sperimentazione alternativi utilizzando ad esempio la modellazione computazionale, evitando il ricorso a sperimentazioni animali.

Tuttavia alcuni progressi sono stati fatti. Nell'ambito del Regolamento REACH è stata adottata nel 2018 una restrizione degli ftalati DIBP, DBP, BBP e DEHP in alcuni articoli che tiene in considerazione anche gli effetti combinati delle quattro sostanze.

Inoltre, per quanto riguarda la presenza di sostanze chimiche negli alimenti, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha pubblicato nel 2019 una guida per armonizzare le metodologie di valutazione del rischio delle miscele, sia a livello umano che animale (Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals).

Tuttavia, non vi è ancora un orientamento unico a livello europeo per la valutazione degli effetti combinati delle sostanze chimiche.

Risulta, dunque, di primaria importanza la definizione di un approccio per la valutazione delle miscele, anche attraverso l'utilizzo di dati ambientali di contaminazione.

A novembre 2018 è stato firmato un accordo di collaborazione tra il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare e l'IRSA-CNR per l'individuazione di un approccio metodologico per valutare le miscele negli ecosistemi, anche in collaborazione con l'Università degli Studi di Milano Bicocca (Prof. Antonio Finizio). In tale ambito, è stata individuata la lettera-

News

tura scientifica nazionale, europea ed internazionale di interesse per gli scopi previsti, includendo anche i principali riferimenti regolatori. In particolare è stata esaminata la letteratura internazionale di riferimento più aggiornata in ambito di valutazione del rischio delle miscele, consultando anche documenti di lavoro e rapporti tecnici pubblicati nei siti della Commissione europea, dell'ECHA, del JRC, dell'OECD, dell'Agenzia Europea per l'Ambiente, dell'EFSA, del WHO/IPCS, dell'EPA, e ne è stata fatta un'analisi critica.

Sulla base della letteratura individuata sono stati analizzati i diversi approcci teorico/modellistici utilizzati a livello europeo e internazionale per selezionare i modelli più appropriati per la valutazione della tossicità delle miscele, ed in particolare un approccio teorico ed uno teorico/empirico. Tali approcci sono stati applicati a scenari di riferimento a livello nazionale,

considerando sia i contaminanti individuati dalla WFD, sia diversi contaminanti emergenti. In particolare sono stati scelti dei corpi idrici con dati di monitoraggio, considerando come fonti la letteratura scientifica nazionale ed internazionale (riferita a casi di studio italiani) e dati forniti direttamente dalle ARPA regionali (Lazio, Lombardia, Friuli Venezia Giulia) ed alcuni punti di campionamento sono stati selezionati in base all'uniformità di informazioni reperite e completezza di dati. Su tali punti è in corso l'elaborazione di mappe georeferenziate nelle quali i risultati delle elaborazioni effettuate vengono visualizzate

in modo intuitivo.

Parallelamente, è stato anche costituito un Gruppo di Lavoro "ad hoc" in cui vi è la partecipazione di esperti dell'ISS, dell'ISPRA, dell'Università Milano Bicocca, dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano, oltre che dell'IRSA.

Il 25 giugno si è tenuto in modalità telematica il workshop conclusivo dal titolo "*Valutazione degli effetti combinati delle miscele di sostanze chimiche- Digital Workshop*", organizzato congiuntamente dall'IRSA e Ministero dell'Ambiente. Tra i relatori, oltre che esponenti del Ministero dell'Ambiente e dell'IRSA-CNR, erano presenti rappresentanti dell'ISS, dell'ISPRA, dell'Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri e dell'Università degli Studi di Milano Bicocca e dell'EFSA.

L'evento, oltre ad avere avuto lo scopo di presentare i risultati delle attività svolte nell'ambito dell'accordo di collaborazione tra Ministero dell'Ambiente e IRSA-CNR, ha costituito l'occasione per un confronto e aggiornamento sulla materia, in vista delle azioni che la Commissione Europea avvierà nei prossimi mesi. Il workshop, infatti, ha avuto una partecipazione attiva, in collegamento attraverso la piattaforma *GoToMeeting*, di più di 180 iscritti su tutto il territorio Nazionale appartenenti alle ARPA, al centro REACH, Università e Aziende private connesse all'analitica ambientale.

Le presentazioni e gli atti del workshop saranno messi on-line sul sito del Ministero dell'Ambiente

Per maggiori informazioni contattare:

Paola Grenni

grenni@irsa.cnr.it

Serena Santoro

santoro.serena@minambiente.it



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Notiziario dei Metodi Analitici
& IRSA News

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

ISSN 2465-017X

Autorizzazione Tribunale di Tivoli n°5/2015

Direzione e Redazione

Istituto di Ricerca sulle Acque, Area della Ricerca RM1, Montelibretti, S.P. 35d, km 0,700
C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

Telefono: 06 90672 850

Fax: 06 90672 787

e-mail: notiziario@irsa.cnr.it

Direttore responsabile

Giuseppe Mascolo

Direttore Scientifico

Stefano Polesello

Comitato di Redazione

L. Campanella, L. Guzzella, S. Polesello, L. Patrolecco, S. Valsecchi

Segreteria di Redazione

S. Ghergo



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