Volume 2, aprile 2022

Notiziario dei Metodi Analitici

& IRSA News

ISSN 2465-017X

IRSA CNR

40 Anni con noi!

1981-2021

In questo numero:

Saggio di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis* per la valutazione della qualità delle acque marine e salmastre **3**

Determinazione sperimentale dei coefficienti di ripartizione liquido/solido (K_d) di sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) su campioni di terreno **9**

Determinazione dell'acido perfluoroalchilsolfonico (PFOS) in organismi acquatici mediante tecnica di estrazione QUECHERS e analisi in UPLC-HRMS **17**

News:

I primi 40 anni del Notiziario dei Metodi Analitici per le Acque **28**

Il Progetto Graphil, potenzialità del grafene nei trattamenti delle acque destinate al consumo umano **34**

Microinquinanti organici normati ed emergenti negli ecosistemi artici: un viaggio dalle regioni temperate a quelle polari in uno scenario di cambiamento climatico **37**

LifePlan, un progetto per l'inventario globale della biodiversità **39**

Trattamento dei reflui domestici mediante digestione anaerobica: indagine sperimentale e modellizzazione **42**

Ruolo delle comunità microbiche naturali nella rimozione di due classi di contaminanti organici **45**

Editoriale

Lo scorso anno abbiamo celebrato il 40° anniversario della pubblicazione del numero 1 del Notiziario dei Metodi Analitici per le Acque con un articolo intitolato "Rassegna e considerazioni sui metodi di analisi dei fluoruri nelle acque" a firma del prof. Luigi Campanella dell'Istituto di chimica analitica dell'Università della Sapienza di Roma e del dott. Riccardo Sbrilli del Laboratorio di trattamento dei minerali del CNR di Roma. Per ricordare questo anniversario, in questo numero pubblichiamo un contributo del prof. Campanella che ripercorre l'evoluzione dei metodi analitici alla luce dell'evoluzione della normativa riflessa negli articoli pubblicati nella rivista.

Dopo 40 anni, la nostra rivista è evoluta e si è arricchita di rubriche che presentano anche la vita dell'Istituto attraverso presentazioni di progetti di ricerca e di dottorato, come potete trovare anche in questo numero. In particolare vengono presentati i progetti LifePlan, per l'inventario globale della biodiversità, Graphil, per l'applicazione del grafene nella rimozione di sostanze pericolose, e le attività di ricerca dell'Istituto di Scienze Polari per la ricerca di microinquinanti organici negli ecosistemi artici.

Anche i temi degli articoli di ricerca si sono ampliati in questi 40 anni, includendo anche metodologie di indagine e monitoraggio degli effetti che la pressione antropica sugli ecosistemi acquatici. In questo numero viene presentato un saggio di embriotossicità per la valutazione della qualità delle acque marine e salmastre che utilizza il bivalve *Mytilus galloprovincialis*, specie autoctona molto diffusa nel Mar Mediterraneo. L'idoneità di questa specie nell'impiego nei saggi biologici è stata ampiamente valutata in diversi contesti ambientali. Sono riportate le metodologie di campionamento, di acclimatazione degli organismi alle condizioni del test in laboratorio, di ottenimento dei gameti e di fertilizzazione delle uova.

In un altro contributo viene descritta la determinazione sperimentale dei coefficienti di ripartizione liquido/solido di sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) su campioni di terreno reali prelevati mediante carotaggi nell'area inquinata del Veneto, allo scopo di

implementare una modellistica di trasporto riferita ad acquiferi reali.

Infine, per confermare la vocazione originaria della rivista come strumento di diffusione di metodi analitici chimici per l'implementazione della normativa sulle acque, siamo lieti di pubblicare un contributo di ARPA Toscana sulla determinazione dell'acido perfluoroalchilsolfonico (PFOS) in organismi acquatici mediante tecnica di estrazione dispersiva cosiddetta QUECHERS (*quick*, *easy*, *cheap*, *effective*, *rugged and safe*) e l'analisi mediante UPLC con rivelatore di spettrometria di massa ad alta risoluzione (UPLC-HRMS). Il metodo pubblicato risponde ai requisiti dei metodi analitici utilizzabili per il monitoraggio della Direttiva Quadro sulle Acque.

Stefano Polesello
Direttore Scientifico

Saggio di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis* per la valutazione della qualità delle acque marine e salmastre

a cura di

Francesca Biandolino, Isabella Parlapiano(*), Ermelinda Prato, *Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Taranto*

RIASSUNTO

Scopo del presente contributo è la descrizione di un protocollo metodologico per la conduzione di saggi biologici con il bivalve *Mytilus galloprovincialis*, specie autoctona molto diffusa nel Mar Mediterraneo. L'idoneità di questa specie nell'impiego nei saggi biologici è stata ampiamente valutata in diversi contesti ambientali. Sono riportate le metodologie di campionamento, di acclimatazione degli organismi alle condizioni del test in laboratorio, di ottenimento dei gameti e di fertilizzazione delle uova.

Viene riportato, inoltre, il protocollo relativo al test di tossicità subletale con un tossico di riferimento (controllo positivo) e con matrici ambientali. Il metodo consiste in un'esposizione statica per 48 h di embrioni di *M. galloprovincialis* alla matrice da analizzare. I risultati dei test sono considerati accettabili se alla fine del periodo di esposizione le larve D anormali presenti nel controllo sono ≤ 80%; i risultati possono essere espressi sia come percentuale di larve D anormali sia come valore di EC50, ossia come concentrazione della sostanza tossica che determina anomalie nel 50% degli individui impiegati nel test.

SUMMARY

The purpose of this work is the detailed description of a methodological protocol for conducting biological assays with the bivalve *Mytilus galloprovincialis*, an autochthonous species widespread in the Mediterranean Sea.

The suitability of this species for use in bioassays has been widely evaluated in various environmental contexts. The methods of sampling and acclimatization of the organisms to the laboratory conditions of the test, spawning gametes and fertilization of eggs are reported. The test consists of a static exposure for 48 h of *M. galloprovincialis* embryos to the matrix to be analyzed.

Protocols relating to the sublethal toxicity test with a reference toxic (positive control) and with environmental matrices are reported. The results of the tests are considered acceptable if at the end of the exposure period the abnormal larvae D in the control are ≤ 80%; the results can be expressed either as a percentage of abnormal larvae or as EC50 value, i.e. as the concentration of the toxic substance that determines anomalies of 50% of the individuals employed in the test.

1. INTRODUZIONE

L'ecotossicologia svolge un ruolo importante nella difesa e protezione degli ecosistemi e delle specie che lo abitano, avendo come obiettivo quello di predire i possibili effetti indesiderati provocati dal rilascio di sostanze potenzialmente tossiche nell'ambiente, determinando soglie ecologiche critiche. Gli studi ecotossicologici sono ormai considerati parte integrante del monitoraggio ambientale, dal momento che forniscono indicazioni utili per stabilire protocolli per la protezione del capitale naturale, per stilare linee guida secondo il principio di precauzione e per formulare adeguate risposte ai cambiamenti ambientali con pronte misure di rimedio ecologico (*restoration*), qualora l'evidenza indichi che sia stata superata un'importante soglia di tollerabilità.

Gli strumenti di cui dispone l'ecotossicologia sono i test di tossicità, che consentono di valutare la frazione biodisponibile degli inquinanti, singolarmente ed in miscela, sugli organismi viventi. I test consistono nell'esposizione di organismi (specie test o bioindicatori), a campioni naturali (acqua, reflui urbani, sedimento, suolo, ecc.) o a soluzioni di sostanze tossiche note, in condizioni sperimentali controllate e per un tempo determinato, al fine di valutarne gli eventuali effetti e il rischio relativo a scenari espositivi sito-specifici (Volpi Ghirardini e Pellegrini, 2001). 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).

La selezione delle specie test da utilizzare nella valutazione della qualità di una matrice ambientale è uno dei punti critici. La scelta dipende dall'obiettivo che si vuole conseguire e dalle caratteristiche peculiari che distinguono gli organismi gli uni dagli altri.

L'affidabilità degli stadi larvali ed embrionali dei molluschi bivalvi come bioindicatori da impiegare nei saggi di tossicità è ampiamente riconosciuta a livello internazionale (ASTM, 1998, ASTM, 2004); l'elevata sensibilità e la rapidità di risposta, infatti, consentono di evidenziare un pericolo ambientale precoce grazie alla valutazione di effetti subletali. I saggi di embriotossicità, infatti, appartengono ai pochi "*short chronic*

* isabella.parlapiano@irsa.cnr.it

tests" per acque marine ed estuarine per i quali l'USEPA (1995) ha prodotto dei protocolli standardizzati.

Mytilus galloprovincialis Lamark, 1819 è il mitilide più diffuso nell'intero bacino del Mediterraneo sebbene si ritrovi anche sulle coste atlantiche sino alle coste della Manica occidentale. È un mollusco bivalve lamellibranco, dotato di branchie e lamelle, attraverso le quali respira e si nutre. Caratteristiche quali abbondanza e ampia distribuzione nelle aree costiere ed estuarine, tolleranza agli stress ambientali (variazioni di temperatura e di salinità), facile campionabilità, trasportabilità e maneggiabilità, adattamento alle condizioni di laboratorio, elevata sensibilità all'insulto chimico, fanno di *M. galloprovincialis* un valido "bioindicatore" nella valutazione dell'inquinamento chimico in ambiente acquatico in grado di fornire endpoint facilmente osservabili (Losso et al., 2004; Volpi Ghirardini et al., 2005; Prato et al., 2006; Prato & Biandolino 2007; Prato et al, 2007; 2009).

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il principio del saggio consiste nell'esporre gli embrioni di *M. galloprovincialis* a sostanze tossiche note o a matrici ambientali per la valutazione della tossicità di sedimenti o di estratti provenienti da ambienti marini e/o salmastri. L'effetto misurato è la percentuale di larve-D (primo stadio della larva *veliger*) anormali trovate 48h dopo la fertilizzazione delle uova. In questo periodo, infatti, l'organismo si trova in una fase particolarmente delicata dello sviluppo embrionale poiché si verificano importanti modificazioni a livello fisiologico che portano alla formazione del *veliger* e quindi l'esposizione a sostanze tossiche potrebbe causare la morte degli embrioni, il rallentamento dello sviluppo, o uno sviluppo non corretto delle larve (Brunelli et al., 2004) .

3. MATRICI E SOSTANZE DA TESTARE

Le più comuni tipologie di campioni da testare con il saggio biologico di sviluppo embrionale sono generalmente le seguenti:

- campioni acquosi di ambienti marini o salmastri (acqua della colonna ed effluenti di scarico);
- campioni acquosi derivanti da sedimenti di ambienti marini o salmastri (acqua interstiziale ed elutriati);
- soluzioni acquose di sostanze chimiche, preparati solubili, preparati che possono essere mantenuti in sospensione o dispersione stabile nelle condizioni di prova.

4. CAMPIONAMENTO E ACCLIMATAZIONE DEGLI ORGANISMI

La zona costiera per il campionamento degli animali deve essere scelta accuratamente, dato che deve essere lontana da contaminazioni antropiche. Nel Mediterraneo la maturazione delle gonadi avviene verso la fine dell'estate, l'emissione dei gameti inizia nel mese di ottobre fino alla tarda primavera quando la temperatura è al di sotto dei 20°C (Pastore et al., 1980; Cecchelli e Rossi 1984; Matarrese et al., 1993).

Figura 1. *Mytilus galloprovincialis*

Durante o subito dopo le mareggiate gli individui possono risultare stressati ed aver già emesso i gameti in mare; inoltre non è infrequente che l'emissione avvenga durante il trasporto o al momento del trasferimento in acquario. Gli animali devono essere trasportati avvolti in un canovaccio bagnato con acqua di mare all'interno di una borsa termica. Una volta in laboratorio si effettua una prima selezione degli organismi, allontanando gli individui morti o danneggiati.

Gli organismi selezionati possono essere subito impiegati per il test oppure stabulati in acquario fino all'esecuzione dello stesso. Prima di essere stabulati, i mitili sono sottoposti a pulizia delle valve per liberarli da epibionti e incrostazioni. La stabulazione, avviene in acquari di vetro (circa 30 animali per 100 litri) provvisti di sistema di aerazione, con acqua di mare a temperatura uguale a quella presente nel sito di prelievo al fine di evitare shock termici. Per il successo della stabulazione è consigliabile somministrare un mix di microalghe, costituito da *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis suecica*, e un fotoperiodo di 12h/12h luce/buio, mediante lampade a neon o a LED. La dieta deve essere somministrata tre volte a settimana in quantitativi tali da non fare mai mancare il cibo

Giornalmente devono essere rimossi i *pellet* fecali presenti sul fondo di ogni vasca attraverso sifonatura e gli eventuali organismi morti. Ogni 24 h devono essere monitorati la temperatura, la salinità (35-38 ‰), il pH (8-8,2), l'ossigeno disciolto (alla saturazione), l'ammoniaca e i nitrati (devono risultare assenti)

5. SOLUZIONI

5.1 Acqua di mare o acqua artificiale

Per la preparazione dei controlli negativi, dei controlli positivi, delle soluzioni della sostanza da sottoporre alla prova e per la raccolta e/o diluizione dei gameti, è possibile utilizzare acqua di mare naturale o artificiale purché vengano garantiti effetti misurati non superiori al 20% nel controllo negativo. Generalmente è preferibile utilizzare acqua di mare naturale prelevata da un'area lontana da impatti antropici e filtrarla a 0,45 µm (*Filtered Salt Water*, FSW). In alternativa può essere utilizzata acqua marina artificiale, ad esempio

preparata secondo la ricetta ASTM (1998) o con altri sali commerciali, verificando con attenzione la risposta dei controlli.

5.2 Soluzioni

I reagenti utilizzati per la preparazione delle soluzioni di prova e di controllo devono essere di grado analitico. Le soluzioni del tossico di riferimento (controllo positivo) sono preparate a partire da soluzioni madri commerciali. Una delle sostanze tossiche di riferimento più utilizzate per i mitili, è il rame in forma di nitrato di rame $Cu(NO_3)_2$, (99,9 % purezza). L'uso di una sostanza tossica di riferimento è necessario per valutare in condizioni standard il potere discriminante della specie test in presenza di un tossico. Ciò permette di ottenere informazioni sulla precisione del metodo e sulla riproducibilità intralaboratorio, attraverso il confronto con apposite carte di controllo per garantire che venga stimato correttamente l'effetto misurato nel saggio.

5.3 Carte di controllo

Per i saggi ecotossicologici è necessario realizzare le opportune carte di controllo tanto per i controlli negativi che per i controlli positivi. Quelle per i controlli negativi consentono di verificare il rispetto dei criteri di validità spesso indicati dal metodo (ad esempio sopravvivenza minima nel controllo negativo in un saggio di tossicità letale). Le carte relative ai controlli positivi permettono di accertare che venga stimato correttamente l'effetto valutato dal saggio (ad esempio, la percentuale di effetto osservata per una determinata concentrazione di un tossico di riferimento). In condizioni normali, il risultato di ogni nuovo saggio dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio delle precedenti EC_{50} (media ± 2 volte la deviazione standard). Viceversa, se la EC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi e in quel periodo sperimentale dovrebbero essere considerati con cautela.

6. STRUMENTAZIONE

6.1 Acquari dotati di un appropriato sistema di aerazione per l'acclimatazione degli organismi;
6.2 Camera termostatata a 18 ± 2 °C;
6.3 Pompa a vuoto per la filtrazione dell'acqua con filtri 0,45 µm;
6.4 Strumento per la determinazione della salinità;
6.5 Termometro;
6.6 pH-metro;
6.7 Ossimetro;
6.8 Microscopio ottico per il controllo e la conta dei gameti e per la lettura dei campioni (obiettivi 4x, 10x, 40x e 100x).

7. MATERIALI

7.1 Vassoi/vaschette per usi generali di laboratorio
7.2 Carta bibula
7.3 Setacci ASTM
7.4 Vetrini orologio
7.5 Pipette Pasteur in plastica da 2 mL
7.6 Micropipette automatiche e/o manuali graduate da 0,10 mL a 5,00 mL
7.8 Beakers in vetro borosilicato da 50, 500 e 1000mL
7.9 Filtro in nitrocellulosa con porosità di 0,45 µm
7.10 Parafilm
7.11 Piastre sterili in polistirene con 24 pozzetti da 3 mL dotate di coperchio

8. PROTOCOLLO METODOLOGICO

8.1 Emissione dei gameti

Prima dell'emissione dei gameti i riproduttori vengono puliti, privati del bisso e non alimentati nelle 24h ore precedenti la stimolazione, per ridurre l'espulsione di feci e pseudo-feci che potrebbero causare infezioni batteriche e quindi minacciare la sopravvivenza larvale. In questa fase i riproduttori vengono stimolati collettivamente in un'unica vasca.

La stimolazione degli individui maturi può essere indotta in diversi modi. Il metodo più praticato è lo shock termico, che consiste nel sottoporre i mitili a una serie ripetuta di bagni termici in acqua di mare con salinità di 36±2‰ a cicli alterni a temperature di 18°C e 28°C ciascuno ogni 30 minuti; contemporaneamente i riproduttori possono essere stimolati con l'aggiunta di gameti precedentemente uccisi (tramite congelamento). Nel caso in cui dopo 4 bagni ripetuti l'emissione dei gameti non sia ancora avvenuta, è possibile provare a indurla iniettando KCl 0,5 M nel muscolo adduttore posteriore (US EPA, 1995; ASTM, 2004) oppure tramite trattamento chimico aggiungendo all'acqua di mare perossido di idrogeno 5 mM in ambiente basico (pH 9,1) per 15 minuti, reintroducendo successivamente i riproduttori in acqua di mare non trattata (Turolla et al., 2002).

L'emissione dello sperma appare lattiginosa e nuvolosa, mentre le uova appaiono sotto forma di liquido granulare color giallo-arancio. I maschi, in genere, emettono prima delle femmine, e data la breve durata di vita degli spermatozoi, è opportuno bloccare l'emissione dei maschi, fino all'ottenimento delle uova da parte delle femmine, serrando le valve con grossi elastici. Non appena incomincia l'emissione delle femmine, queste vengono poste singolarmente in *beaker* riempiti con circa 200 mL di acqua filtrata, dove prosegue il rilascio dei gameti. Terminata la deposizione delle uova, si liberano i maschi dagli elastici e in un volume minimo di acqua di mare filtrata (l'acqua deve ricoprire appena le valve) si raccolgono gli spermatozoi di ogni singolo individuo, in una soluzione concentrata. Per assicurare una migliore qualità dei gameti, gli animali devono essere lasciati emettere per un periodo non superiore ai 30 minuti alla temperatura di 18°C. È consigliabile l'impiego di due operatori distinti per la raccolta indipendente dei gameti maschili e femminili, onde evitare una fecondazione accidentale delle uova. I gameti devono essere preliminarmente osservati al microscopio per valutarne la

qualità: una piccola quantità di uova prelevata con una pipetta Pasteur in plastica deve essere posizionata su un vetrino da orologio ed osservata al microscopio (obiettivi 4x e 10x). Sono da scartare le uova che ad un controllo ottico a campione appaiono vacuolate, irregolari o piccole. Per gli spermi viene valutata la motilità

8.2 Fecondazione

Tutte le uova ritenute idonee (provenienti dalle femmine selezionate) verranno riunite in un unico pool mediante filtrazione con un setaccio a maglia di 100 µm e raccolte in un cilindro graduato da 500 mL (sospensione A) nel quale verrà inoculato lo sperma. La concentrazione dello sperma deve essere molto più bassa di quella delle uova per evitare fecondazioni multiple (polispermia) che determinerebbero la morte larvale. In genere, per fecondare 3-4 milioni di uova sono sufficienti 5 mL di sperma. Si procederà quindi alla stima della densità delle uova tramite diluizioni successive. A tal fine dal cilindro vengono prelevati 10 mL di sospensione di uova e portati a volume in un nuovo cilindro da 250 mL (sospensione B). La determinazione del numero medio di uova va fatta in un volume di 0,1 mL prelevato dalla sospensione B effettuando più conte, così da estrapolare la quantità di inoculo da trasferire in ogni pozzetto della piastra.

$$\text{Uova medie in 0,1 mL } (X_M)$$
$$\text{Uova in 1 mL } (X_{mL}) = X_M * 10$$

Il numero di uova presenti nel cilindro da 500 mL ($X_{500/mL}$) è calcolato secondo la formula:

$$(X_{500/mL}) = (X_{mL} * 250) / 10$$

Se si vogliono inoculare circa 200 uova fecondate per pozzetto in 3 mL di soluzione test (ossia 60-70/mL), il volume da prelevare dalla sospensione A concentrata, risulta pari a:

$$V\ (\mu L) = (200 * 1000) / X_{500/mL}$$

Il tempo di fecondazione è di circa 15-20 min. È possibile accertarsi dell'avvenuta fecondazione esaminando al microscopio ottico (10x) un campione di uova: la fecondazione ha avuto successo se circa il 90% delle uova presenta il globulo polare.

Dopo la fecondazione si procede al lavaggio delle uova facendo passare la sospensione attraverso due setacci (100 µm e 36 µm). Le uova passeranno attraverso il setaccio di 100 µm e si raccoglieranno sul setaccio a maglia più piccola (36 µm) lasciando passare gli spermatozoi in eccesso.

8.3 Allestimento dei test

È consigliabile effettuare la prova il giorno stesso della raccolta dei gameti.

Per l'esecuzione dei test devono essere allestite almeno 3 repliche per ognuno dei seguenti campioni:

- il controllo negativo (in sola acqua di mare);

- il controllo positivo, (con un tossico di riferimento);

- la matrice ambientale o altre soluzioni da testare.

Nel caso della matrice ambientale, l'allestimento minimo del saggio biologico finalizzato al calcolo di una Concentrazione di Effetto (EC) prevede diluizioni del campione (ad esempio 100 %, 50 %, 25 %, 12,5%, 6,25%).

8.4 Esecuzione del test con il tossico di riferimento

La prova del controllo positivo prevede la preparazione delle soluzioni del tossico di riferimento secondo un'appropriata scansione delle concentrazioni, diluendo con acqua di mare (naturale o artificiale) volumi idonei di una soluzione madre concentrata.

Le concentrazioni di rame idonee all'individuazione dell'EC_{50}, per *M. galloprovincialis* sono 3, 6, 12, 24, 48 µg/L e sono ottenute partendo da una soluzione standard 1000 mg/L di ($Cu(NO_3)_2$)

8.5 Esecuzione del test di embriotossicità

Una volta riempite le piastre con le soluzioni test, il volume V di sospensione di uova fecondate viene aggiunto in ciascun pozzetto, avendo cura di agitare la sospensione continuamente durante il prelievo. Le piastre vanno mantenute in cella termostatica al buio a 18 ± 1 °C. per 48h.

8.6 *Lettura dei test*

Trascorse le 48h lo sviluppo larvale viene arrestato aggiungendo una goccia di Lugol come fissativo in ciascun pozzetto. Una corretta lettura dei test prevede il conteggio per osservazione diretta al microscopio ottico di 100 individui/camera test, distinguendoli tra larve normoformate e larve malformate.

L'*endpoint* è rappresentato dal numero di lave D

Figura 2. Larva D normoformata

Figura 3. Larve anormali .

anormali. Una larva è considerata normale quando la conchiglia risulta essere a forma di lettera D e il mantello non protrude fuori dalla conchiglia (Fig. 2), e anormale se non completa lo sviluppo fino allo stadio di *veliger*, arrestandosi agli stadi prelarvali che vanno dalle prime divisioni cellulari allo stadio di trocofora, o se presenta difetti morfologici (conchiglia malformata o danneggiata, mantello sporgente, cerniera convessa) (Fig.3).

8.7 Elaborazione dei dati

I dati ottenuti possono essere espressi come Percentuale di Effetto applicando la formula di Abbott (Finney, 1971) che confronta e normalizza la percentuale di larve D malformate in ogni camera test rispetto al controllo:

$$\text{Abbott} = (X-Y)/(100-Y) * 100$$

dove:

X = % di effetto nel campione testato;

Y = % di effetto nel controllo.

8.8 Validità dei risultati

Affinché la prova sia considerata valida, la percentuale nel controllo negativo di larve D normoformate deve essere ≥ 80% (ASTM, 2004).

La deviazione standard delle repliche di uno stesso campione non dovrebbe essere maggiore del 5 %. Se ciò dovesse accadere, è possibile scartare la replica che si discosta maggiormente dalla media.

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).

Dal 2003 al 2021, a seguito di numerosissimi saggi di embriotossicità eseguiti con il mitilo nei laboratori IRSA di Taranto, possiamo affermare che i limiti della carta di controllo ottenuta da più operatori, comprende valori di EC50 in un intervallo tra 10,42 e 12,55 µg/L usando il rame come sostanza tossica di riferimento.

CONCLUSIONI

L'inserimento dei saggi ecotossicologici nel contesto normativo nazionale sta assumendo sempre più un ruolo chiave per la valutazione della qualità dei comparti ambientali. Pertanto, al fine di garantire una maggiore confrontabilità dei risultati, è necessaria la disponibilità di protocolli metodologici che assicurino, unitamente alla significatività scientifica, i requisiti di una elevata rappresentatività ambientale e di una sufficiente manualità esecutiva da raggiungere e mantenere anche attraverso continui inter-confronti, tra differenti laboratori. Il saggio di embriotossicità con *M. galloprovincialis* risponde bene a questi requisiti essendo un metodo relativamente facile da applicare, affidabile ed estremamente utile negli studi ambientali e di monitoraggio.

Tabella 1. Tabella riassuntiva dei parametri utilizzati per il test di embriotossicità con il Mytilus galloprovincialis .

Parametri	Condizioni test
Tipo di Test	Statico
Temperatura	18 ± 2°C
Salinità	36 ± 1 ‰
Acqua di diluizione	FSW 0,45 µm
N° di Repliche	3
N° di zigoti per replica	100
Durata del test	48h
Endpoint	Larve D anormali
Accettabilità	Larve D normoformate ≥ 80%
Analisi dei dati	Trimmed Spearman- Karber o Probit Analysis; T-test

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1998): "Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Test Starting with Embryos of Four Species of saltwater Bivalve Molluscs" ASTM E724-98

ASTM (2004). "Standard Guide for conducting static acute toxicity test starting with embryos of four species of saltwalter Bivalve Molluscs. ASTM E 724 – 98.

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.

BRUNELLI, F., GELLI, F., PREGNOLATO L., PUMO T.C., SCIALOJA M.G., BENCIVELLI S., SELVATICO L., RONCARATI A., SAVORELLI F. (2004): "Rilevazione delle emergenze idriche con sensori di preallarme e valutazione della qualità delle acque destinate alla molluschicoltura con test ecotossicologici su Mytilus galloprovincialis." Biologia Marina Mediterranea, 11 (2): 490-492.

CECCHERELLI V. U., ROSSI R. (1984). Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Mar. Ecol. Prog. Ser.,16: 173-184.

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.

FINNEY D. J. (1971): "Probit Analysis", 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 333 pp.

HAMILTON M.A., RUSSO R.C., THURSTON R.V. (1977): "Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays", Environmental Science&Technology, 11: 714-719

LOSSO C; HIS E; GHETTI P.F.; VOLPI GHIRARDINI A (2004): "Sensitivity of embryotoxicity test with Mytilus *galloprovincialis (Lmk) towards some compounds of environmental interest (copper and pesticides)*", Environmental Technology, 25 (7): 841-846

MATARRESE A., TURSI A., COSTANTINO G., POLLICORO R. (1993): "The reproductive cycle of Mytilus galloprovincialis Lamarck in the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea)", Oebalia 2: 20-61.

PASTORE M. (1980): "Riproduzione di *Mytilus galloprovincialis* Lmk ed *Ostrea edulis* L., nei mari di Taranto: collettori usuali e collettori sperimentali per l'attecchimento delle larve. I Nota preliminare", Memorie di Biologia Marina ed Oceanografia, 10: 247-254.

PRATO E. BIANDOLINO F., SCARDICCHIO C. (2006): "Sublethal effects of copper on *Mytilus galloprovincialis* larvae", Biologia Marina Mediterranea 13(2): 350-351.

PRATO, E., BIANDOLINO, F. (2007): "Combined toxicity of mercury, copper and cadmium on embryogenesis and early stages of the *Mytilus galloprovincialis"*. Environmental Technology, 28: 915-920

PRATO E. BIANDOLINO F., SCARDICCHIO C. (2007): Individual and combined toxicity of cadmium, copper and mercury to *Mytilus galloprovincialis*", Biologia Marina Mediterranea 14(1): 197-199.

PRATO E., ACQUAVIVA M.I., LONOCE R., NARRACCI M., BIANDOLINO F., CAVALLO R.A. (2009): "Sensitivity of two *Mytilus galloprovincialis* (Lam., 1819) populations to Copper and Quality Assessment of mussels utilized in embriotoxicity test", Biologia Marina Mediterranea 16 (2): 126-1128.

TUROLLA E., CASTALDELLI G., BARBIN L., ROSSI R., (2002): Induzione all'emissione dei gameti in *Mytilus galloprovincialis*", Biologia Marina Mediterranea, 10: 490-491.

US EPA (1995): "Short-term methods for estimation the chronic toxicity of effluents and receiving water to west coast marine and estuarine organisms", EPA/600/R-136, Cincinnati, Ohio, U.S., 61pp.

VOLPI GHIRARDINI A.; D. PELLEGRINI (2001): "I saggi di tossicità nella valutazione della qualità di acque e sedimenti di ambienti marini e di transizione: indicazioni per la scelta, la messa a punto, la valutazione e l'utilizzo dei metodi". Biologia Marina Mediterranea, 8: 1-16.

VOLPI GHIRARDINI A., LOSSO C., ARIZZI NOVELLI A., BAÙ A., HIS E., GHETTI P.F., (2005): "*Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the Lagoon of Venice (Italy)". Chem. Ecol. 21: 455–463.

Determinazione sperimentale dei coefficienti di ripartizione liquido/solido (K_d) di sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) su campioni di terreno

a cura di

Gianluca Coppola (*), Massimo Peruzzo, *Eurolab srl, San Giuseppe di Cassola (VI)*

Massimo Mazzola, *Arpa Veneto, Dipartimento Provinciale di Vicenza, Vicenza*

Roberto Lava, *Arpa Veneto, Dipartimento Regionale Laboratori, Sede di Venezia Mestre (VE)*

Stefano Polesello, Claudia Ferrario, *IRSA-CNR, Brugherio (MB)*

RIASSUNTO

In questo lavoro viene presentata la determinazione sperimentale dei coefficienti di ripartizione liquido/solido (K_d) di sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) su campioni di terreno reali prelevati mediante carotaggi. La derivazione sperimentale delle costanti sia di adsorbimento che di desorbimento è di fondamentale importanza per l'implementazione di una modellistica di trasporto riferita ad acquiferi reali. I valori delle costanti ottenuti sperimentalmente sono confrontati coi dati disponibili in letteratura e con quelli derivati mediante modelli per comprendere i meccanismi di adsorbimento di PFAS nei suoli.

Le osservazioni in questo studio suggeriscono che sia il contenuto in carbonio organico che altre proprietà chimiche chiave superficiali dei suoli svolgono un ruolo importante nell'influenzare l'adsorbimento dell'acido perfluoroottansolfonico (PFOS) e degli altri PFAS, in particolare i perfluoroalchilcarbossilati che, essendo acidi deboli, sono più sensibili alla densità di carica superficiale del terreno o al loro pH .

SUMMARY

In this work the experimental determination of the liquid/solid partition coefficients (K_d) of perfluoroalkyl substances (PFAS) on real soil samples, sampled by coring, is presented. The experimental derivation of the constants of both adsorption and desorption is fundamental for the implementation of a transport model in real aquifers. The values of the constants obtained experimentally are compared with the data available in the literature and with those derived by models, to understand the mechanisms of PFAS adsorption in soils.

The results of this study suggest that both the organic carbon content and other key chemical properties of surface soil play an important role in the adsorption of perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) and other PFAS, particularly for the perfluoroalkyl carboxylates which, being weak acids, are more sensitive to the surface charge density of the soil or their pH .

1. INTRODUZIONE

Il destino e il comportamento delle sostanze poli- e per-fluoroalchiliche (PFAS) nel suolo e sottosuolo, in particolare il loro potenziale di ritenzione e rilascio, non sono stati ancora completamente compresi, sebbene i PFAS siano stati rilevati in un'ampia gamma di concentrazioni nei depositi naturali. I terreni sono un importante serbatoio di PFAS, e rappresentano un potenziale rischio per le acque sotterranee a causa della loro possibile lisciviazione.

Il più studiato tra i PFAS, per quanto riguarda l'adsorbimento nel suolo, è l'acido perfluoroottansolfonico (PFOS). Date le sue intrinseche caratteristiche chimico-fisiche, tra le quali quella di essere un tensioattivo, i modelli sviluppati per spiegare il destino e comportamento dei classici contaminanti organici non ionizzabili possono essere inappropriati per descrivere il destino di PFOS nel suolo.

Esistono studi contrastanti sulle proprietà che influiscono sul comportamento di adsorbimento del PFOS nel suolo e nei sedimenti. Una recente rassegna (Li et al., 2018) ha evidenziato come nessuna singola proprietà del suolo possa spiegare da sola il comportamento di adsorbimento dei PFOS nel suolo e ha suggerito che una combinazione di contenuto di carbonio organico, pH e contenuto di argilla sono le proprietà minime del suolo necessarie a descrivere l'adsorbimento di PFOS. Nel complesso, l'adsorbimento di PFOS nel suolo dipende dal contenuto (e dalla qualità) di carbonio organico e dalle proprietà chimiche del suolo superficiale. I terreni con un alto contenuto di carbonio organico totale (TOC) offrono siti per la ripartizione idrofobica e tendono a mostrare un elevato adsorbimento di PFOS, riflettendo la suscettibilità della catena perfluoroalchilica alle interazioni idrofobiche nei suoli. Inoltre, l'adsorbimento di PFOS generalmente aumenta nei terreni con livelli elevati di ossidi di Al e Fe amorfi, specialmente a intervalli di pH acidi.

È importante sottolineare che i terreni a carica variabile con livelli elevati di ossidi di Al (e Fe) dovrebbero mostrare una carica superficiale netta positiva e una

* sviluppo@eurolabanalysis.com

sufficiente capacità di scambio anionico. I terreni contenenti anche livelli, da moderati ad elevati, di carbonio organico del suolo a pH acido, ci si aspetta che mostrino un migliore adsorbimento di PFOS rispetto ai terreni contenenti il TOC come unica fase adsorbente. Suoli con caratteristiche simili di carbonio organico e carica superficiale hanno in generale anche un K_d simile per il PFOS, e può essere il contenuto di limo o argilla a differenziarne l'adsorbimento di PFOS. Nei terreni a carica variabile che mostrano un maggiore adsorbimento di PFOS, ci si può aspettare che il potenziale di lisciviazione dei PFOS sia minimo, in particolare dove il pH del suolo rimane acido (Umeh et al., 2021). Studi contrastanti sulle relazioni tra proprietà del suolo e K_d del PFOS generano incertezze critiche che possono limitare la corretta valutazione e la gestione efficace dei siti contaminati da PFOS. È necessario perciò affiancare all'uso di dati modellistici o di letteratura, che sono molto variabili in funzione dei modelli e delle caratteristiche dei terreni, dati sperimentali sito-specifici misurati sui terreni sui quali è necessaria la valutazione delle proprietà di adsorbimento e desorbimento dei PFAS.

Nel 2013 è stata scoperta dal CNR-IRSA una contaminazione su larga scala con PFAS in Veneto, a seguito delle emissioni di un impianto fluorochimico in provincia di Vicenza (WHO, 2017). Dagli anni '70 l'azienda chimica MIteni ha scaricato PFAS e, come rilevato dalle successive indagini dell'ARPAV, l'inquinamento ha interessato sia le acque superficiali che quelle sotterranee poiché l'impianto è situato nell'area di ricarica degli acquiferi. Di conseguenza, i PFAS sono stati trovati nell'acqua potabile distribuita in rete attraverso i numerosi pozzi acquedottistici presenti nell'area. Studi specifici hanno dimostrato che l'estesa propagazione dei PFAS attraverso la falda freatica e la rete idrografica superficiale, trova spiegazione nella stretta interconnessione tra i corpi idrici superficiali e sotterranei. Complessivamente la contaminazione si è estesa su un'area di 930 km² situata all'interno del bacino idrografico Brenta-Bacchiglione e interessa tre diverse province (Vicenza, Padova e Verona). Per decenni, il pennacchio di contaminazione delle acque sotterranee si è propagato da Trissino (VI) fino a 18 km in direzione est e fino a superare i 35 km in direzione sud-sud-est, raggiungendo un'estensione totale stimata di 190 km². I Comuni totalmente o parzialmente serviti da acquedotti contaminati sono trenta e contano complessivamente circa 140.000 abitanti potenzialmente esposti ad alte dosi di PFAS attraverso l'acqua potabile (Pitter et al., 2020).

Poiché tra le attività svolte nell'ambito del progetto Europeo LIFE PHOENIX (LIFE16 ENV/IT/000488) vi era lo sviluppo di strumenti previsionali attraverso l'implementazione della modellistica idrogeologica nell'area interessata dall'inquinamento da PFAS, si è resa necessaria la determinazione sperimentale dei coefficienti che determinano il trasporto e la distribuzione dei contaminanti nelle acque sotterranee nell'area di studio del progetto. Tra questi, in particolare, i coefficienti di ripartizione liquido/solido (K_d) riconducibili al fenomeno dell'adsorbimento rivestono un ruolo di primaria importanza per la propagazione dell'inquinamento. Data la natura degli inquinanti in oggetto e l'assenza di dati bibliografici di riferimento certi, si è reso necessario procedere alla loro determinazione sperimentale attraverso specifiche prove di laboratorio in accordo con le metodiche standardizzate OECD (2000). Il disegno sperimentale predisposto ha visto prima il campionamento delle matrici ambientali di studio attraverso la realizzazione di tre specifici carotaggi rappresentativi dell'area interessata dal pennacchio di inquinamento, e successivamente la determinazione sperimentale dei coefficienti di ripartizione dei principali acidi perfluoroalchlici (PFAA).

I coefficienti di distribuzione solido-liquido per l'adsorbimento (K_d^{ads}) e il desorbimento (K_d^{des}) per i diversi PFAA sono stati determinati interpretando i dati sperimentali di adsorbimento-desorbimento all'equilibrio con un modello lineare, dove K_d^{ads} è definito come il rapporto tra la concentrazione della sostanza nel suolo e la concentrazione di massa della sostanza nella soluzione acquosa dopo che è stato raggiunto l'equilibrio di adsorbimento (Chen et al., 2016; Milinovic et al., 2015; OECD, 2000):

$$K_d^{ads} = \frac{c_s^{ads}(eq)}{c_{aq}^{ads}(eq)} \quad (mL/g) \qquad (1)$$

ove C_s^{ads} (ng/g) è la concentrazione di sostanza adsorbita sul suolo all'equilibrio di adsorbimento e C_{aq}^{ads} (µg/L) è la concentrazione della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento. Entrambe le concentrazioni sono state determinate analiticamente per ricavare le costanti finali, mentre nelle fasi di sviluppo C_s^{ads} è stato calcolato sulla base della frazione rimasta in fase acquosa (OECD, 2000):

$$c_s^{ads} = \frac{\left(c_0 - c_{aq}^{ads}(eq)\right) * V_0}{m_{soil}} \quad (ng/g) \qquad (2)$$

dove C_0 (µg/L) è la concentrazione di massa iniziale della singola sostanza nella soluzione di prova all'inizio dell'esperimento, V_0 (mL) è il volume della soluzione nella fiala di prova e m_{soil} (g) massa del terreno sulla base del peso secco.

Il coefficiente di desorbimento (K_d^{des}) è dato come:

$$K_d^{des} = \frac{c_s^{des}(eq)}{c_{aq}^{des}(eq)} \quad (mL/g) \qquad (3)$$

dove C_s^{des} (ng/g) è il contenuto della sostanza adsorbita sul suolo all'equilibrio di desorbimento e C_{aq}^{des} (µg/L) è la concentrazione di massa di PFAA, desorbito dal suolo e di conseguenza presente nella fase acquosa all'equilibrio, entrambi determinati analiticamente.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Lo scopo di questo lavoro è stato la stima del comportamento di adsorbimento/desorbimento di alcuni acidi perfluoroalchilici (PFAA) in diversi tipi di terreno reali prelevati nell'area di diffusione dell'inquinamento in falda tra le province di Vicenza, Padova e Verona. L'obiettivo è ottenere un valore di adsorbimento che possa essere utilizzato per prevedere la ripartizione in una varietà di condizioni ambientali reali; a tal fine, i coefficienti di adsorbimento di equilibrio per una sostanza chimica in vari terreni sono determinati in funzione delle caratteristiche del suolo (carbonio organico, contenuto di argilla, tessitura del suolo e pH).
Il metodo di riferimento utilizzato è bas*ato sulla linea guida OECD n. 106 del 2000: Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Metho*d (OECD, 2000), che prevede tre livelli. Il livello 1 è lo studio preliminare, il livello 2 è il test di screening e il livello 3 è la determinazione delle isoterme di adsorbimento e di desorbimento di Freundlich, a seconda dei casi. Nel nostro esperimento ci siamo limitati al livello 2, calcolando le costanti di adsorbimento/desorbimento ad una concentrazione fissa, dopo aver verificato il raggiungimento dell'equilibrio, mediante la determinazione delle curve di adsorbimento/desorbimento. Sono possibili due metodi di analisi: il metodo indiretto e il metodo diretto. Il metodo indiretto consiste nell'aggiunta della sostanza in esame alla soluzione in contatto col terreno, nell'agitazione della miscela per un tempo appropriato, nell'analisi della fase acquosa dopo la centrifugazione e nella filtrazione della sospensione del terreno. La quantità di sostanza in esame adsorbita sul campione di terreno è calcolata come differenza tra la quantità di sostanza in esame inizialmente presente in soluzione e la quantità rimanente alla fine dell'esperimento. Questo metodo è stato adottato durante lo sviluppo del test per cercare le condizioni di equilibrio. Il metodo diretto consiste invece nell'estrazione ed analisi delle due fasi all'equilibrio ed è stato usato per derivare le costanti di adsorbimento e desorbimento.

3. CAMPIONAMENTO

Per lo studio in oggetto sono state scelte da ARPAV cinque differenti campioni di terreno prelevati in provincia di Vicenza. I due siti di prelievo sono stati Tezze di Arzignano (45° 32' 22.292834'' N; 11° 22' 23.913038'' E) e Vicenza (45° 33' 6.027969'' N; 11° 30' 58.535647'' E). Le caratteristiche dei campioni sono le seguenti:

Campione 1: matrice prevalente Ghiaia, 15-16 m (in falda), 3 aliquote; località: Tezze di Arzignano (VI), alta pianura alluvionale, acquifero freatico;

Campione 2: matrice prevalente Ghiaia (Limo argillosa), 33-34 m (in falda), 3 aliquote; località: Tezze di Arzignano (VI), alta pianura alluvionale, acquifero freatico;

Campione 3: matrice prevalente Argilla (limosa), 22-22,5 m (in falda), 3 aliquote; località: Vicenza, media pianura alluvionale, 1° *aquitard*;

Campione 4: matrice prevalente Sabbia, 28,50-29 m (in falda), 3 aliquote; località: Vicenza, media pianura alluvionale, 1° acquifero;

Campione 5: matrice prevalente Ghiaia, 29,5-30 m (in falda), 3 aliquote; località: Vicenza, media pianura alluvionale, 1° acquifero.

I singoli campioni raccolti con carotaggio meccanico sono stati sottoposti a vagliatura in campo della frazione superiore ai 2 cm e successivamente omogeneizzati al fine di ottenere delle aliquote rappresentative dell'orizzonte campionato.

4. APPARECCHIATURE

4.1 Sistema UPLC HRMS (Dionex Ultimate 3000 accoppiato con Orbitrap Q Exactive Focus Thermo Fisher Scientific);

4.2 Colonna Cromatografica Raptor C18; 50 mm x 2.1 mm x 1.8 µm (Restek).

5. REATTIVI

5.1 Acido formico per analisi HPLC (Merck);

5.2 Metanolo per analisi HPLC (Honeywell);

5.3 Cloruro di calcio purezza >97% (Sigma Aldrich);

5.4 Acqua ultrapura;

5.5 Miscela Standard PFAS Custom (CPA Chem);

5.6 Miscela standard interni *Mass-Labelled PFC Extraction Standard* (Wellington Laboratories Inc.).

6. METODO

6.1 Analisi dell'acqua e del suolo

Le analisi dell'acqua sono state effettuate per iniezione diretta della soluzione nel sistema cromatografico. Il campione, dopo il periodo di agitazione, è stato leggermente centrifugato per 30 secondi a 1500 rpm, e lasciato decantare per 15 minuti. Un'aliquota è stata filtrata con filtri in nylon 0,45 µm e infine ad 800 µL di campione acquoso sono stati aggiunti 200 µL di metanolo in modo da avere una soluzione di iniezione Acqua milliQ/Metanolo (80:20 v/v).
100 µL della soluzione finale sono stati iniettati nel sistema UPLC-HRMS dotato di colonna UPLC Raptor C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm, T colonna 40°C ± 2°C, Flusso 0,3 mL/min), utilizzando il gradiente di eluizione presentato in Tabella 1.

Le condizioni del rivelatore Orbitrap sono state ionizzazione ESI negativa, Full Scan Detection, con risoluzione 70000 FWHM.

Per l'analisi del K_d, è stata analizzata anche la frazione del suolo all'equilibrio. In questo caso un campione di acqua addizionato di PFAS è stato portato all'equilibrio, dopo di che la frazione acquosa è stata completamente rimossa attraverso centrifugazione.

L'estrazione dei composti dal suolo prevede un'aggiunta al campione di un volume 1:2 di una soluzione

Tabella 1. Gradiente di eluizione cromatografico. Fase mobile A) Acqua milliQ con 0.1% di Acido Formico e 5 mM ammonio Formiato¸ B) Metanolo con 0.1% di Acido Formico

Tempo (minuti)	Fase Mobile A (%)	Fase Mobile B (%)
0	100	0
1	100	0
1,5	45	55
6	25	75
7	25	75
7,1	2	98
9,5	2	98
9,51	100	0
11	100	0

di metanolo allo 0,1% di acido formico, con successivo passaggio di 10 minuti in sonicatore e 30 minuti di vortex.
Un'aliquota di 200 µL di estratto è stata diluita con 800 µL di acqua milliQ e la soluzione risultante è stata analizzata come prima descritto per i campioni acquosi.

6.2 Prova di adsorbimento

Per il test di adsorbimento si seguono le linee guida OECD 106. Ciò ha previsto una fase di preliminare per conoscere il giusto rapporto acqua/suolo da utilizzare durante il test definitivo. Si è scelta la matrice limo per il test preliminare.
Sono state testati tre rapporti suolo/acqua (1:1; 1:5; 1:25).
Per il test è stata usata una soluzione di $CaCl_2$ 0.01M in acqua come indicato sempre dalla OECD. Il volume di acqua utilizzato per il test è stato addizionato in modo tale che risultasse nella fase acquosa una concentrazione di PFAS pari a 1 µg/L. Il tempo di equilibrazione scelto è di 24h, con 6 punti di campionamento rispettivamente al tempo 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h, mantenendo il campione sotto agitazione per tutte le 24h.
In seguito al test preliminare, sono stati definiti i rapporti suolo/acqua e si è proceduto con il test di adsorbimento, per valutare il tempo di raggiungimento dell'equilibrio e calcolare il K_d. Durante il test preliminare si sono notate discrepanze di comportamento tra PFAS dal C4 al C8 e dal PFOS a catene più lunghe. Quindi il test ha previsto due rapporti suolo/acqua differenti con tempi di equilibrazione diversi, ossia 2h per i composti a catena lunga, 48h per composti a catena inferiore al C8.
Per il campionamento, il test OECD 106 prevede due tipologie di campionamento: parallelo e seriale. Per la maggior semplicità dei calcoli e anche praticità, seppur più laborioso, si è scelto il metodo parallelo.

Tabella 2. Risultati sperimentali delle analisi sui suoli e misura delle costanti di adsorbimento e desorbimento

Campione	1	2	3	4	5
TOC g/kg	72,9	69,4	52,4	59,7	55,9
pH	6,95	6,54	6,31	6,32	6,80
Limo 50µm>Ø>2µm	17,9	27,9	79,2	13,8	21,1
Sabbia 2µm>Ø> 50 µm	77,5	64,1	4,8	82,9	74,6
Argilla Ø<2µm	4,6	8	16	3,3	4,3
K_d^{ads}					
PFBA	1,5	1,0	0,5	0,3	0,1
PFBS	12,0	12,0	6,0	6,0	6,0
PFPeA	0,7	0,8	0,4	0,1	0,2
PFHxA	0,6	0,6	0,3	0,3	0,9
PFHpA	0,5	0,8	0,6	0,5	0,4
PFOA	5,1	9,0	4,4	2,8	7,3
PFOS	180,0	66,2	19,2	47,1	23,1
PFNA	4,2	40,0	22,5	17,5	21,6
PFDA	320,0	21,0	71,5	208,5	90,0
K_d^{des}					
PFBA	211	211	170	211	118
PFPeA	521	258	258	1222	n.d.

6.3 Prova di desorbimento

La prova di desorbimento prevedeva il raggiungimento dell'equilibrio tra fase acquosa e fase suolo, la rimozione dell'acqua tramite centrifugazione, e aggiunta di acqua senza PFAS. Per questa prova sono stati mantenuti i rapporti suolo/acqua usati nella prova di adsorbimento, mentre la durata del test è stata di 48h per entrambi i rapporti scelti. Il sistema di campionamento anche in questo caso è stato quello in parallelo.

6.4 Analisi granulometriche

Per l'analisi granulometrica è stato utilizzato il metodo riportato nel DM 13/09/1999: "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo", Met II.4 (Dispersione del campione di suolo per l'analisi granulometrica) e II.5 (Determinazione della granulometria per setacciatura ad umido e sedimentazione). Questo metodo si basa sulla legge di Stokes, che determina la velocità di caduta di particelle di dimensione nota in fluidi. Il terreno viene mantenuto in agitazione in una soluzione di esametafosfato di sodio e successivamente

introdotto in cilindri di vetro per sedimentazione previa setacciatura a 100 µm (0,1 mm). La parte di campione trattenuta dal setaccio viene posta in stufa a 105°C e successivamente setacciata per la determinazione delle frazioni 2-0,25 mm e 0,25-0,10 mm. La parte di campione che ha passato il setaccio viene mantenuta in sospensione nel cilindro di sedimentazione; terminata la fase di agitazione, a tempi e altezze di prelievo definite in base alla dimensione delle particelle che si vogliono individuare, vengono prelevate con pipetta quantità note di sospensione, poste a seccare in stufa a 105°C e successivamente pesate. Vengono effettuati 3 prelievi che permettono di individuare le frazioni di dimensione 0,10-0,05 mm, 0,05-0,02 mm, 0,02-0,002 mm (per differenza) e < 0,002. I risultati sono riportati in Tabella 2.

6.5 Analisi del contenuto organico

Per la determinazione del contenuto organico è stata utilizzata la norma UNI EN 15936:2012 "Determinazione del carbonio organico totale (TOC) mediante combustione secca", usando il metodo di determinazione diretta.

Il campione viene pretrattato, aggiungendo un piccolo volume di acido fosforico diluito per rimuovere la frazione di CO_2 presente in esso e tenendolo per almeno 4h in stufa ad una temperatura che non superi i 40° C. Successivamente il campione viene analizzato con l'apposita strumentazione, dove viene messo a contatto con un gas di trasporto contenente ossigeno e bruciato a temperature comprese tra i 900 e 1500° C. La quantità di CO_2 rilasciata dalla combustione viene rilevata e quantificata con spettrometria IR. I risultati sono riportati in Tabella 2.

7. RISULTATI DEI TEST DI ADSORBIMENTO E DESORBIMENTO

7.1 Test Preliminare

È stata condotta una serie di test preliminari a tre rapporti suolo/acqua (1:1; 1:5; 1:25) su due campioni di suolo (campioni 2 e 3), per identificare i tempi di esposizione e il miglior rapporto utile alla determinazione del coefficiente di adsorbimento, applicando il nomogramma presentato nel metodo OECD 106. In uno step successivo di ottimizzazione della procedura, i test preliminari sono stati eseguiti esclusivamente sul campione 2.

Nel caso del rapporto suolo/acqua 1:5, per i composti con catena ≤C8, si osserva un adsorbimento abbastanza rapido nel giro di un'ora di circa il 30-40%, dopodiché sono visibili fenomeni di adsorbimento e desorbimento lungo le 24h, probabilmente per i molteplici punti di scambio ionico dati dalla matrice. Per gli acidi perfluoroalchilici da C4 al C9 (PFOS escluso), il rapporto suolo:acqua ottimale è risultato quello 1:5.

Un caso a parte è stato il PFNA (C9), che invece ha mostrato un rapido adsorbimento nelle prime ore fino a circa il 60%, con un fenomeno di desorbimento e un raggiungimento dell'equilibrio dopo 8h. In questo caso si tiene in considerazione il rapporto 1:5.

Per gli acidi perfluorocarbossilici (PFCA) >C9 e PFOS, considerati PFAS a catena lunga, l'adsorbimento sul suolo è stato troppo rapido in queste condizioni (rapporto 1:5). Il PFOS mostra adsorbimento totale nel giro di un'ora e questo andamento è confermato anche dai PFAS con catena lunga C10 (PFDA) e C11 (PFUnA). Per queste sostanze è stato quindi necessario scegliere un rapporto maggiore, per ridurre la % di adsorbimento sul terreno e poter misurare la sostanza in acqua. Durante queste prove preliminari e successivamente durante le prove di adsorbimento/desorbimento, è stata valutata la stabilità delle soluzioni in funzione dei contenitori utilizzati per l'esperimento in accordo con il metodo OECD. Nonostante la naturale tensioattività dei PFAS e quindi la loro tendenza a formare film sulle pareti dei contenitori è stato dimostrato che non ci sono fenomeni di adsorbimento e la soluzione di PFAS ha una stabilità >90% nel tempo del test.

7.2 Curve di adsorbimento

In seguito ai test preliminari sono state utilizzate le seguenti condizioni di esposizioni per la misura dei coefficienti di adsorbimento:

PFBA, PFPeA, PFBS, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA: rapporto suolo acqua (1:5); t = 0, 8, 24, 33, 48 h.

PFOS, PFDA, PFUnA: rapporto suolo acqua (1:25); t = 0, 15, 30, 45, 60, 120 min.

In generale PFBA e PFPeA mostrano più mobilità, però dopo 33h raggiungono l'equilibrio, mentre gli altri composti ≤C9 dopo 24h sono all'equilibrio senza mostrare evidenti fenomeni di adsorbimento e/o desorbimento. Per PFOS e PFDA, dalle curve di adsorbimento a più stadi osservate, sembrano attivi più meccanismi successivi di adsorbimento. Nel caso di PFUnA non è stato possibile costruire una curva perché l'adsorbimento è stato troppo rapido. Si riportano come esempio in Figura 1 le curve di adsorbimento di

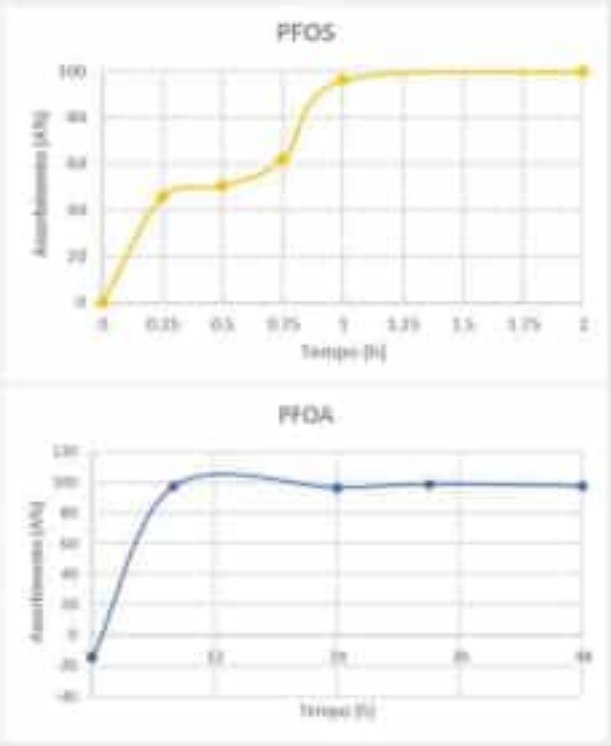


Figura 1. *Curve di adsorbimento di PFOS e PFOA per il campione 5*

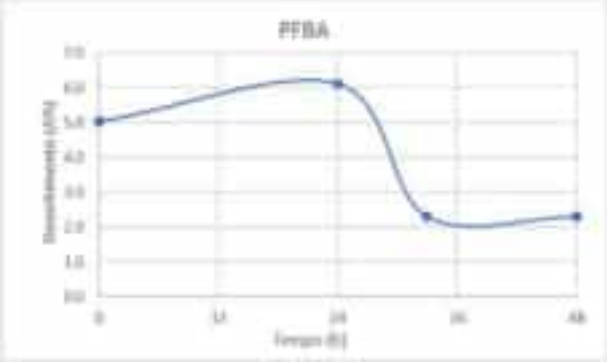


Figura 2. Curva di desorbimento del PFBA nel campione 4

PFOS e PFOA per il campione 5.
I coefficienti di ripartizione K_d sono stati infine calcolati come rapporto tra le concentrazioni di analita misurate nel suolo e nell'acqua all'equilibrio (Tabella 2).
I coefficienti di ripartizione K_d sono stati infine calcolati come rapporto tra le concentrazioni di analita misurate nel suolo e nell'acqua all'equilibrio (Tabella 2).

7.3 Curve di desorbimento

Il test di desorbimento, non mostra evidenze di desorbimento da parte del suolo, se non per i PFCA a catena più corta, quali PFBA e PFPeA. In ogni caso i due composti citati dopo 48h evidenziano un lieve riassorbimento. Le percentuali desorbite anche per questi composti sono assai basse, inferiori al 10%. Solo per questi due composti è stato possibile determinare analiticamente le concentrazioni in acqua e quindi calcolare la relativa costante di desorbimento (Tabella 2). In Figura 2, si riporta come esempio la curva di desorbimento del PFBA nel campione 4.

7.4 Ruolo del carbonio organico nell'adsorbimento di PFAS

Il carbonio organico del suolo è considerato la fase dominante responsabile dell'adsorbimento di PFAS da parte del suolo. Per verificare questa ipotesi abbiamo provato a correlare i dati sperimentali di TOC dei terreni col relativo coefficiente di ripartizione K_d sperimentalmente misurato.
Solo nel caso di PFOS, eliminando però dalla correlazione il campione 1 che sembra avere un comportamento anomalo, si ottiene una correlazione significativa, come si vede dalla Figura 3.

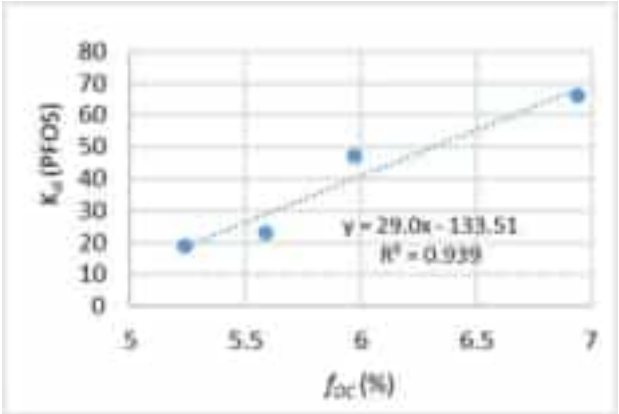


Figura 3 Correlazione tra K_d (L/kg) di PFOS e frazione di carbonio organico (f_{OC} %) dei suoli per valori di K_d inferiori a 100

Tabella 3. Confronto tra valori medi di $LogK_{OC}$ misurati sperimentalmente e valori di $LogK_{OC}$ calcolati col modello EPISUITE

	n°CF_2	$LogK_{OC}$ medio	$LogK_{OC}$ EPISUITE
PFBA	3	1,01	1,34
PFBS	4	2,12	1,93
PFPeA	4	0,83	1,71
PFHxA	5	0,94	2,08
PFHpA	6	0,96	2,45
PFOA	7	1,96	2,82
PFOS	8	3,00	3,41
PFNA	8	2,54	3,19
PFDA	9	3,35	3,56

Il campione 1, in particolare, sembra avere un'affinità molto superiore per il PFOS rispetto agli altri campioni; rispetto agli altri suoli debolmente acidi, questo campione ha pH quasi neutro e quindi una ridotta densità di carica positiva in superficie che potrebbe favorire il meccanismo di adsorbimento lipofilo. Questo testimonia il coesistere di più interazioni in equilibrio variabile tra di loro in funzione della composizione dei suoli.
Per poter confrontare i dati sperimentali con una variabile che sia indipendente dalle caratteristiche del sito, è necessario ricavare i valori sperimentali di K_{OC} dai dati di K_d e TOC, secondo l'equazione:

$$K_{OC} = (K_d * 1000)/TOC$$

In Tabella 3, i valori medi di $LogK_{OC}$ ottenuti sperimentalmente per le diverse sostanze sono confrontati coi dati ottenuti dal modello EPISUITE a partire dai valori modellizzati di K_{OW}.
Per prima cosa è importante sottolineare che tutte le molecole in Tabella 3 possono essere classificate come "molto mobili" (vM), se $LogK_{OC}$ <3, o "mobili" (M), se $LogK_{OC}$ <4, in base alla nuova classificazione REACH proposta dall'Agenzia Federale Tedesca dell'Ambiente (UBA) (Neumann and Schliebner, 2019) e in fase di discussione per una adozione a livello europeo.
L'evidenza sperimentale (Figura 4a) suggerisce che i PFCA ≤C6 non si ripartiscono nella sostanza organica, mentre si ottiene un'ottima correlazione tra il n°CF_2 e $LogK_{OC}$ per PFCA >C6. Quindi sono attivi due meccanismi diversi di ripartizione. Per quanto riguarda gli acidi perfluoroalchilsolfonici (PFSA), si può solo dire che PFBS ha una ripartizione molto superiore del suo omologo PFPeA, suggerendo che per i PFSA il meccanismo di ripartizione idrofobico sia attivo anche per le molecole a catena corta.
Come è evidente dalla Figura 4b si nota invece che il modello EPISUITE deriva i $LogK_{OC}$ in base ad una correlazione lineare con la lunghezza di catena (espressa dal numero di gruppi CF_2), considerando quindi che tutti i PFAS in esame abbiano lo stesso meccanismo di ripartizione nel carbonio organico. L'unica differenza è il termine noto della correlazione

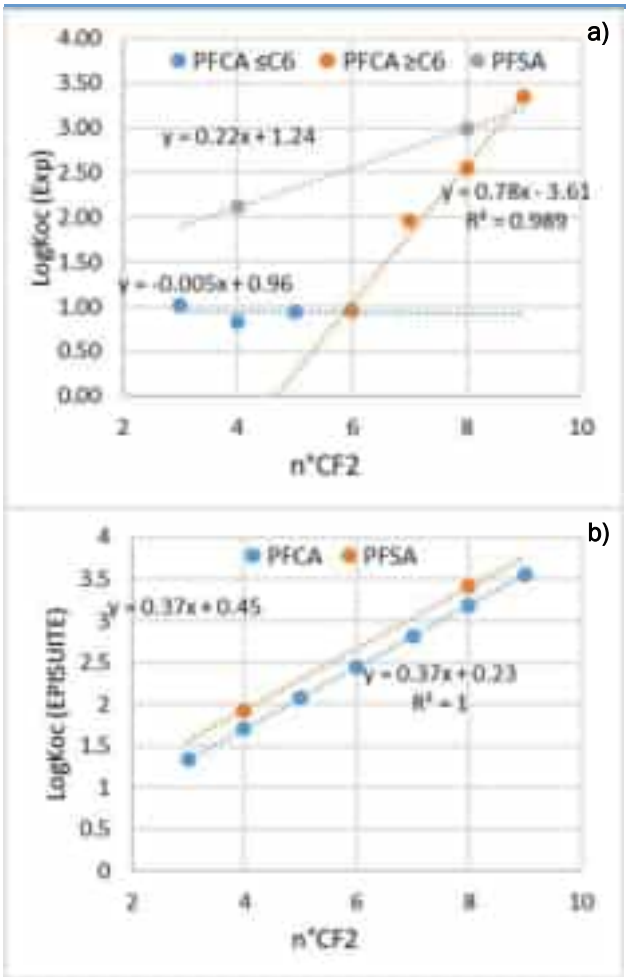


Figura 4. *Correlazione tra LogK_{OC} in funzione della lunghezza di catena (espressa come n°CF_2) per i diversi PFAS;* ***a):*** *LogK_{OC} sperimentali;* ***b)****: LogK_{OC} derivati col modello EPISUITE*

usata per le due classi diverse di composti, gli acidi solfonici (PFSA) e i corrispondenti acidi carbossilici (PFCA).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano come i diversi PFAS hanno K_d molto diverse tra loro.

Per quanto riguarda i PFCA, fino al PFOA le costanti di adsorbimento hanno valori bassissimi, quasi trascurabili. Il PFNA è in una situazione intermedia, dipendente dalle caratteristiche del suolo. Dal PFDA il valore di K_d diventa significativo.

Per quanto riguarda i PFSA, a parità di numero di unità CF_2 essi dimostrano di avere una affinità maggiore per il suolo. Il PFBS ha K_d 20-30 volte superiori a PFPeA, mentre i rapporti tra PFOS e PFNA sono molto variabili.

Le costanti di desorbimento sono state stimate solo per PFBA e PFPeA, e sono comunque molto basse. Per gli altri composti non è stato possibile misurare un desorbimento.

Solo per il PFOS è disponibile un sufficiente numero di dati di letteratura per un confronto. Una recente analisi di 114 suoli in aree temperate e tropicali ha mostrato valori di PFOS K_d che variano da 5,4 a 228,8 mL/g (mediana: 27,8 mL/g) (Umeh et al., 2021).

I dati raccolti confermano che il carbonio organico è sicuramente un parametro molto importante per l'adsorbimento del PFOS, ma attribuire il comportamento di adsorbimento dei PFOS nei suoli esclusivamente al contenuto di carbonio organico di alcuni terreni, utilizzando i coefficienti di adsorbimento del carbonio organico (K_{OC}), è un approccio semplicistico.

I risultati da noi ottenuti non ci consentono di individuare le altre variabili che influenzano l'adsorbimento. Dai dati del presente lavoro si può comunque escludere un'influenza significativa da parte del contenuto di limo, perché per il PFOS il terreno 3 ad alto contenuto di limo è quello con K_D^{ads} più bassa.

Le osservazioni riportate in questo studio suggeriscono che sia il TOC che altre proprietà chimiche chiave dei suoli superficiali svolgono un ruolo importante nell'influenzare l'adsorbimento di PFOS e degli altri PFAS, in particolare i carbossilati che, essendo acidi deboli, sono più sensibili alla densità di carica superficiale del terreno o al loro pH.

RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato svolto e finanziato nell'ambito del progetto LIFE PHOENIX (LIFE16 ENV/IT /000488).

BIBLIOGRAFIA

CHEN H., REINHARD M., NGUYEN V.T., GIN K.Y.H. (2016): "Reversible and irreversible sorption of perfluorinated compounds (PFCs) by sediments of an urban reservoir", Chemosphere, 144, 1747–1753.

LI Y.S.; OLIVER D.P.; KOOKANA R.S. (2018): "A critical analysis of published data to discern the role of soil and sediment properties in determining sorption of per and polyfluoroalkyl substances (PFASs)", Sci. Total Environ., 628–629, 110–120.

MILINOVIC J., LACORTE S., VIDAL M., RIGOL A. (2015): "Sorption behaviour of perfluoroalkyl substances in soils", Sci. Total Environ., 511, 63–71.

NEUMANN M., SCHLIEBNER I. (2019): "Protecting the sources of our drinking water The criteria for identifying Persistent, Mobile, and Toxic (PMT) substances and very Persistent, and very Mobile (vPvM) substances under EU REACH Regulation (EC) No 1907/2006", Umweltbundesamt, UBA, Texte 127/2019.

PITTER G., DA RE F., CANOVA C., BARBIERI G., ZARE JEDDI M., DAPRÀ F., MANEA F., ZOLIN R., BETTEGA A.M., STOPAZZOLO G., VITTORI S., ZAMBELLI L., MARTUZZI M., MANTOAN D., RUSSO F. (2020): "Serum Levels of Perfluoroalkyl Substances (PFAS) in Adolescents and Young Adults Exposed to Contaminated Drinking Water in the Veneto Region, Italy: A Cross-Sectional Study Based on a Health

Surveillance Program", Environ. Health Perspect., 128, 27007.

OECD (2000), "Test No. 106: Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method", OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris.

UMEH A., NAIDU R., SHILPI S., BOATENG E., RAHMAN A., COUSINS I., CHADALAVADA S., LAMB D., BOWMAN M., (2021): "Sorption of PFOS in 114 Well -Characterized Tropical and Temperate Soils: Application of Multivariate and Artificial Neural Network Analyses", Environ. Sci. Technol., 55, 1779–1789.

WHO (2017), "Keeping our water clean: the case of water contamination in the Veneto Region, Italy", World Health Organization Regional Office for Europe ed. 2017.

Determinazione dell'acido perfluoroottansolfonico (PFOS) in organismi acquatici mediante tecnica di estrazione QUECHERS e analisi in UPLC-HRMS

a cura di

Michele Mazzetti (*), Andrea Agostini, Paolo Altemura *ARPAT, Area Vasta Litoranea, Livorno*

RIASSUNTO

Nel presente articolo viene presentato il metodo per la determinazione analitica di PFOS nella matrice "pesce" a concentrazioni comprese tra 1 e 20 µg/kg. Il metodo può essere usato per la verifica di conformità con il SQABIOTA previsto dalla normativa vigente (D.Lgs 172/2015) per il parametro PFOS. Il metodo si basa sulla tecnica di estrazione dispersiva cosiddetta QUECHERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) e l'analisi mediante UPLC con rivelatore di spettrometria di massa ad alta risoluzione (UPLC-HRMS).

Il metodo con LOQ pari a 1 µg/kg e incertezza estesa del 50%, risponde ai requisiti dei metodi analitici utilizzabili per il monitoraggio della Direttiva Quadro sulle Acque.

SUMMARY

This article presents the method for the analytical determination of PFOS in the "fish" matrix at concentrations between 1 and 20 µg/kg. The method can be used to compliance checking with the SQA_{BIOTA} required by current legislation (Legislative Decree 172/2015) for the PFOS parameter. The method is based on the so-called QUECHERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) dispersive extraction technique and analysis using UPLC with high resolution mass spectrometry detector (UPLC-HRMS). The method with LOQ equal to 1 µg/kg and expanded uncertainty of 50%, meets the requirements of the analytical methods that can be used for monitoring under the Water Framework Directive.

1. INTRODUZIONE

La "Direttiva quadro sulle acque" (WFD) adottata nel 2000 stabilisce un quadro per la protezione di tutte le acque superficiali in tutta Europa e definisce una strategia contro l'inquinamento chimico dei corpi idrici superficiali. Uno degli obiettivi chiave della direttiva quadro sulle acque è quello di raggiungere un buono "stato chimico" di tutte le acque superficiali garantendo che le concentrazioni di sostanze prioritarie (PS) e sostanze pericolose prioritarie (PHS) siano mantenute al di sotto dei rispettivi standard di qualità ambientale (SQA). Sebbene la maggior parte degli SQA sia fissata per la matrice acqua, la Direttiva 2008/105/CE modificata dalla Direttiva 2013/39/UE include anche SQA applicabili nel biota (vale a dire SQA_{biota}) per una serie di sostanze chimiche bioaccumulabili che possono rappresentare una minaccia per gli ecosistemi e la salute umana attraverso l'ingestione di prede contaminate o il consumo di alimenti contaminati provenienti dall'ambiente acquatico. Gli SQA_{biota} sono espressi come concentrazione nel tessuto corporeo di organismi preda, essenzialmente pesci che occupano un livello trofico (TL) sufficientemente alto nella rete trofica da garantire la protezione dei principali predatori (cioè TL 4 nelle acque superficiali continentali e TL 5 in acque marine) (CE, 2018). Questo vale per PS che sono inclini (o sospettati di) biomagnificazione.

Il monitoraggio dell'andamento del biota è richiesto anche per diverse altre sostanze prioritarie che tendono ad accumularsi in questo comparto. Infatti, il biota (come i sedimenti) è in grado di integrare le concentrazioni di inquinanti in un arco di tempo (solitamente mesi), mentre l'acqua è più variabile. Analogamente, gli Stati membri possono preferire monitorare la conformità agli SQA espressi come concentrazioni di acqua dai residui nel biota (ossia utilizzare il biota per dedurre le concentrazioni nell'acqua), ad esempio quando la sensibilità analitica è inadeguata per quantificare gli SQA nell'acqua a causa degli effetti di diluizione e di una diminuzione della solubilità dei contaminanti organici idrofobici (HOC) e dei metalli nelle acque di transizione, costiere e marine.

Tra le sostanze prioritarie per le quali sono stati fissati SQA_{biota} con la Direttiva 2013/39/UE, recepita col D.Lgs 172/2015, vi è anche l'acido perfluoroottansolfonico (PFOS), sostanza assai diffusa nelle acque e negli ecosistemi per le sue caratteristiche di elevata persistenza e bioaccumulabilità. Poiché lo SQA_{acqua} è fissato ad una concentrazione molto bassa e di difficile raggiungibilità analitica (0,65 ng/L), può risultare più pratico ed efficace effettuare il monitoraggio per la WFD sulla matrice pesce, per il quale è stato fissato un SQA_{biota} di 9,1 µg/kg p.f.. Il presente articolo presenta la validazione di un metodo analitico per la determinazione di PFOS in organismi acquatici, in particolare pesci.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo prevede l'estrazione dell'acido Perfluoroottansolfonico (PFOS) da aliquota di saggio di omogenato di pesce intero con metodica estrattiva QUECHERs in analogia a quanto riportato nello standard UNI EN

* **m.mazzetti@arpat.toscana.it**

15662: “Alimenti di origine vegetale - Multimetodo per la determinazione dei residui di pesticidi utilizzando GC e LC dopo estrazione/separazione con acetonitrile e purificazione mediante SPE dispersiva - Metodo modulare QuEChERS2”. L’estrazione è seguita da uno stadio di purificazione su colonna di estrazione in fase solida (SPE) non in linea (off line).

La rilevazione e quantificazione degli analiti avviene mediante diluizione isotopica previa aggiunta all’aliquota di saggio di una quantità nota di ^{13}C8 PFOS utilizzando la tecnica cromatografia liquida ad alta prestazione e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HRMS) con tecnologia ORBITRAP e ionizzazione Electrospray (ESI) negativa.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Metodo per la determinazione analitica di PFOS nella matrice “pesce” a livelli di concentrazione (campo di misura) compresi tra 1 e 20 µg/kg. Il metodo può essere usato per la verifica del rispetto dello SQA_{BIOTA} previsto dalla normativa vigente (D.Lgs 172/2015) per il parametro PFOS. Il metodo risponde ai requisiti dei metodi analitici utilizzabili per il monitoraggio WFD, secondo i criteri della Direttiva 2009/90/CE, recepita col D.Lgs. n. 219 del 10 dicembre 2010.
In accordo con quanto riportato nelle “Linee guida per il monitoraggio delle sostanze prioritarie (secondo D.Lgs 172/2015)” (Manuale ISPRA 143/2016) è stato optato di eseguire la determinazione analitica sul pesce intero in quanto come recita il riferimento: “è l’opzione più semplice e conservativa ma può portare a una eventuale sovrastima del rischio per la salute umana. Questa opzione è comunque consigliata per armonizzare il monitoraggio di specie diverse, nella misura in cui sia possibile ottenere un campione rappresentativo della totalità del pesce, anche per pesci di dimensioni rilevanti” .

4. CAMPIONAMENTO

Il campionamento è eseguito da personale specializzato pescando pesci che, nutrendosi di piccoli invertebrati e detriti organici, vengono in contatto con i sedimenti del fondale (es. Cefalo) e selezionando, per le analisi, esemplari di lunghezza superiore ai 15 cm ovvero con tre o quattro anni di vita.

5. MATERIALI E APPARECCHIATURE

5.1 Normale vetreria da laboratorio;

5.2 Bilancia tecnica con sensibilità di 0,01 g;

5.3 Omogeneizzatori ceramici;

5.4 Agitatore Vortex;

5.5 Mulino a coltelli Grindomix GM 300;

5.6 Sistema di eluizione per colonne SPE a caduta gravimetrica;

5.7 Siringa in plastica da 10 mL con adattatore per colonne SPE;

5.8 Centrifuga in grado di alloggiare tubi tipo Falcon o equivalenti da 50 mL e di raggiungere una velocità di rotazione dii 10000 giri al minuto (rpm);

5.9 Vials per cromatografia in materiale plastico, dotati di riduzione interna da almeno da 0,3 mL compatibili con Thermo Open Accela con tappo a vite perforabile;

5.10 Sistema HPLC/HRMS Thermo Accela 1250/ Thermo Orbitrap Exactive con autocampionatore Thermo Open Accela;

5.11 Colonne SPE Agilent EMR Captiva 3 mL, 300 mg;

5.12 Colonna HPLC: Phenomenex Kinetex F5, 100 mm, 3 mm, 2,6 µm.

6. REATTIVI

6.1 Pouches di sali per metodica QUECHERs 15662 (Agilent 5982-5650 o equivalenti);

6.2 Metanolo (grado LC-MS);

6.3 Acetonitrile puro per analisi di residui;

6.4 Acqua HPLC-MS grade;

6.5 Isopropanolo (grado LC-MS);

6.6 Acido formico (grado LC-MS);

6.7 Ammonio formiato (grado LC-MS);

6.8 Ammonio idrossido al 37 % puro per analisi;

6.9 Magnesio solfato anidro puro per analisi;

6.10 Sodio cloruro puro per analisi;

6.11 Soluzione di materiali di riferimento di Sostanze Perfluoroalchiliche (PFAS) nativi: Wellington Lab PFAC-MCX native 2000 ng/mL in metanolo contenente acido perfluoroottansolfonico (PFOS) alla concentrazione di 2000 ng/mL;

6.12 Soluzione di materiali di riferimento di Sostanze Perfluoroalchiliche (PFAS) isotopicamente marcati per estrazione: Wellington Lab MPFAC-C-ES ILS 2000 ng/mL in metanolo contenente ^{13}C8 acido perfluoroottansolfonico (^{13}C8-PFOS) alla concentrazione di 2000 ng/mL;

6.13 Soluzione di materiali di riferimento di Sostanze Perfluoroalchiliche (PFAS) isotopicamente marcati per iniezione: Wellington Lab MPFAC-C-ES ILS 2000 ng/mL in metanolo contenente 1,2,3,4^{13}C4C4 acido perfluoroottansolfonico (1,2,3,4^{13}C4-PFOS) alla concentrazione di 2000 ng/mL;

6.14 Materiale di riferimento certificato: IRMM 427 Pike Perch Muscle Homogenate (PFASs in fish tissue).

7. METODO

7.1 Preparazione delle soluzioni

Soluzioni di lavoro di reagenti:

- Soluzione metanolica di ammoniaca al 2%: In un

matraccio da 20 mL immettere 1,1 mL di ammonio idrossido al 37% e portare a volume con metanolo;

- Soluzione Acetonitrile/Acqua 80/20: Prima di ogni sessione analitica preparare la soluzione in oggetto aggiungendo 20 mL di acqua ogni 80 mL di acetonitrile;
- Soluzione HPLC: Fase eluente A: Acqua, formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,0025%, metanolo, 2%;
- Soluzione HPLC: Fase eluente B: Metanolo 83%, Isopropanolo 15%, Acqua 2% formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,0025%.

Soluzioni di lavoro di materiali di riferimento:

Le tre soluzioni di lavoro, contenenti composti nativi o isotopicamente marcati, devono avere una concentrazione di 200 ng/L. La data di scadenza di tali soluzioni, se correttamente conservate, è di un mese dalla data di preparazione e, comunque, non può essere successiva alla data di scadenza stabilita dal produttore per il materiale originario.

La preparazione viene fatta trasferendo 200 µL di ciascuna soluzione commerciale (2000 ng/mL) di materiale di riferimento in un matraccio tarato da 2 mL e portando a volume con metanolo.

Tutte le soluzioni devono essere conservate in recipienti di vetro, alla temperatura di –18°C.

8.2 Estrazione

In un tubo di prova tipo Falcon o equivalente, pesare 2 g di omogenato di pesce e addizionarlo di 30 µL di soluzione metanolica di materiale di riferimento di estrazione isotopicamente marcati a 200 ng/mL (30 µL*200 ng/mL = 6 ng e.a. corrispondente ad una concentrazione di standard isotopicamente marcati, tra cui ^{13}C8-Acido Perfluoorottansolfonico (^{13}C8-PFOS), di 3 µg/kg).

Aggiungere 2 mL di acqua e un omogeneizzatore ceramico, quindi agitare energicamente per un minuto.

Trascorso tale periodo di tempo, aggiungere 10 mL di acetonitrile agitare energicamente per un minuto.

Al termine di tale periodo aggiungere una pouche di sali per metodica QUECHERs 15662, agitare energicamente per 1 minuto e centrifugare a 10000 giri al minuto per 10 minuti.

Decantare il surnatante, prelevare 1,2 mL della soluzione acetonitrilica, addizionarlo di 300 µL di acqua e sottoporlo alla procedura di purificazione.

8.3 Purificazione

Caricare gli 1,5 mL di soluzione acetonitrilica diluita su una colonna SPE tipo Agilent EMR Captiva 3 mL, 300 mg e lasciarli eluire per gravità fino a raggiungimento del livello della fase raccogliendo l'eluato.

Aggiungere alla colonna 300 µL di soluzione Acetonitrile/Acqua (80/20), lasciare eluire per gravità fino a livello della fase quindi scaricare completamente la colonna insufflando 10 mL di aria con una siringa in plastica dotata di opportuno adattatore raccogliendo gli eluati.

Omogeneizzare gli eluati riuniti utilizzando un Vortex.

Prelevare 300 µL di eluati riuniti e immetterli in un vial in polipropilene dotato di inserto conico (Phenomenex Verex o equivalenti), da inserire nell'autocampionatore.

Nel caso si voglia verificare la performance strumentale in un certo numero di campioni, si può aggiungere 4,5 µL (0.045 mL) di 30 µL di soluzione metanolica di standard di iniezione isotopicamente marcati a 200 ng/mL.

8.4 Analisi strumentale

L'analisi strumentale viene effettuata mediante cromatografia liquida con rivelatore costituito da uno spettrometro di massa ad alta risoluzione con tecnologia Orbitrap e ionizzazione Electrospray (ESI) negativa.

Gli analiti vengono ricercati operando in modalità di scansione totale (Full Scan) (risoluzione pari almeno a 50000, una accuratezza di massa di 5 ppm).

Con l'apparecchiatura utilizzata, tale valore di risoluzione consente, qualora venga eseguito un solo evento spettrometrico, una velocità di acquisizione di 2 Hz.

Le condizioni spettrometriche e cromatografiche sono riportate nelle tabelle 1, 2, 3, 4.

Tabella 1. Principali parametri cromatografici.

Colonna HPLC	Phenomenex Kinetex F5, 100 mm, 3 mm, 2,6 µm, prodotto esclusivo
Temperatura colonna	35°C
Fase eluente A	Acqua, formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,0025%, metanolo, 2%
Fase eluente B	Metanolo 83%, Isopropanolo 15%, Acqua 2% formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,025%
Volume di iniezione	20 µL
Flusso	400 µL/min

Tabella 2. Gradiente di eluizione in HPLC.

Tempo (minuti)	Fase Eluente A (%)	Fase Eluente b (%)
0	90	10
1	90	10
20	5	95
25	5	95
27	90	10
32	90	10

Tabella 3. Principali parametri spettrometrici.

Scan range	100-1000
Fragmentation	HCD off
Polarity	Negative
Microscans	1
Sheath Gas flow rate	35
Aux Gas flow rate	18
Sweep Gas flow rate	0
Spray Voltage	4,00
Capillary temperature	275°C
Capillary Voltage	67,5
Tube lens Voltage	190
Skimmer Voltage	20
Heater temperature	30°C

Tabella 4. Parametri di acquisizione dello spettrometro.

Event	1
Polarity	negative
Resolution	High (50000) Ultra High (100000)
ACG Tgt	High Dynamic Range
Max injection time	100 msec
Fragmentation	off
HCD	none
Lock mass	on (negative mode 112.98468)
Scan range	100-1000

Relativamente alla modalità di scansione completa (full scan) in ionizzazione negativa, sono ricercati i seguenti rapporti massa/carica caratteristici (tab. 5).

Le masse degli ioni frammento degli analiti saranno ricercate con otto cifre significative (cinque cifre decimali) ma, se richiesto, riportate con sei cifre significative (tre cifre decimali).

Tabella 5. Rapporti massa/carica acquisiti.

Analita	Formula ione deprotonato	Ione quantificatore target m/z
Acido Perfluoorottansolfonico (PFOS)	$C_8F_{17}O_3S$	498,93022
^{13}C8-Acido Perfluoorottansolfonico (PFOS)	$^{13}C_8F_{17}O_3S$	506,95706
1,2,3,4^{13}C8-Acido Perfluoorottansolfonico (PFOS)	1,2,3,4-$^{13}C_4C_4F_{17}O_3S$	502,94364

8.5 Identificazione degli analiti

Gli analiti sono identificati e confermati quando è rilevato il picco relativo allo ione di quantificazione (Target) al tempo di ritenzione del materiale di riferimento puro (si ritiene accettabile uno scostamento di ± 10 s da quest'ultimo) con una sostanziale coincidenza con il tempo di ritenzione del ^{13}C8-PFOS e del 1,2,3,4^{13}C8-PFOS.

8.6 Calcolo ed espressione del risultato

In accordo a quanto riportato nello studio del metodo (vedi APPENDICE), la determinazione del PFOS, nell'intero campo di misura del metodo, è attuata secondo la tecnica denominata SIDA (Stable Isotope Diluition Analysis) basata sulla quantificazione su singolo punto.

Ogni aliquota da saggio viene addizionata di una quantità di PFOS ^{13}C8 (standard di estrazione) pari a 3 µg/kg (30 µL di Soluzione di Standard di Estrazione Isotopicamente Arrichiti a 200 ng/mL).

La concentrazione del PFOS viene determinata secondo la seguente equazione:

La quantificazione è stata eseguita secondo la seguente equazione:

$$C_x = (A_x / A_{xILS}) \times C_{xILS}$$

dove:

C_x = Concentrazione dell'analita x (PFOS)

A_x = Area relativa al picco dello ione quantificatore dell'analita x (PFOS)

A_{xILS} = Area relativa al picco dello ione quantificatore dell'analita x isotopicamente arricchito (ILS: ^{13}C8-PFOS)

C_{xILS} = Concentrazione dell'analita x isotopicamente arricchito (ILS: ^{13}C8-PFOS)

I risultati sono espressi in microgrammi/chilo (µg/kg) con un massimo di tre cifre dopo la virgola (esempio 0,00X µg/Kg) e massimo tre cifre significative (esempio 0,XXX o X,XX o XX,X µg/Kg).

8.7 Precisione e incertezza

8.7.1 Limite di ripetibilità

Come dettagliatamente riportato nello studio del metodo (vedi APPENDICE), sulla base della partecipazione all'esercizio interagenziale eseguito nell'estate del 2019 (Formenton et al., 2021), è stato calcolato un valore di limite di ripetibilità del 16% che è stato espanso al 20% a causa della inferiore omogeneità delle aliquote di saggio di pesce intero fresco in confronto al materiale impiegato nel circuito sopramenzionato.

8.7.2 Esattezza

Come dettagliatamente riportato nello studio del metodo (vedi APPENDICE), la valutazione dell'esattezza

del metodo è stata attuata, oltre che attraverso la partecipazione al già citato esercizio interagenziale, attraverso analisi replicate di materiale certificato IRMM 427, Pike Perch Muscle Homogenate (PFASs in fish tissue) ottenendo, complessivamente, i seguenti valori: (tabella 6)

Tabella 6. Valori di esattezza ottenuti nel processo di validazione.

Campione	Analita	Valore medio µg/Kg	Valore di riferimento µg/Kg	Esattezza%
IRMM 427	PFOS	16,7	16,0	104
Circuito Interagenzie	PFOS	2,50	2,46	102

I dati ottenuti non differiscono significativamente dai valori di consenso.

Inoltre, conformemente alla Decisione 2002/657/CE, punto 1.43, che stabilisce che "Per esattezza si intende la concordanza tra il valore medio ottenuto da un'ampia serie di risultati e un valore di riferimento accettato", nel presente metodo l'esattezza è espressa secondo la seguente equazione:

$$Esattezza = (M_x)/(R_x) \times 100$$

in cui:

M_x= Concentrazione media dell'analita x determinata dal laboratorio

R_x= Concentrazione di riferimento dell'analita x

Applicando l'equazione, si ottengono i valori di esattezza riportati nella tabella 6.

Poiché la normativa di riferimento (Direttiva 2009/90/CE) non riporta alcun riferimento relativo al parametro in esame, l'esattezza del metodo è stata valutata secondo quanto riportato nella Decisione 2002/657/CE che stabilisce (Tabella 2 "Esattezza minima dei metodi quantitativi") per "concentrazioni ≤1 µg/Kg" un intervallo di esattezza accettabile "da – 50 % a + 20 %" (50-120%).

Sulla base di quanto sopra riportato l'esattezza calcolata tramite la l'analisi del materiale certificato e di quello oggetto del circuito interagenziale è stata giudicata accettabile.

8.7.3 Incertezza

Come dettagliatamente riportato nello studio del metodo (vedi APPENDICE), utilizzando i dati di ripetibilità e di riproducibilità osservati con la partecipazione al circuito interagenziale e i dati ottenuti dalle analisi replicate di materiale di riferimento certificato (IRMM427), si è deciso di applicare i seguenti valori di incertezza:

Tabella 8. Limite di Quantificazione (LOQ) e Limite di Rivelabilità (LOD) .

Limite di Quantificazione (LOQ) µg/kg	Limite di Rilevabilità (LOD) µg/kg
1	0,3

- incertezza per valori pari o superiori a 9,1 µg/kg (SQA): 50%;
- incertezza per valori inferiori a 9,1 µg/kg (SQA): 57 %.
- Il valore dell'incertezza estesa, comprensivo di un fattore di copertura di 2, viene assunta pari al 57% del valore trovato, in tutto il campo di misura.

8.7.4 Limite di quantificazione e di rivelabilità

È stata costruita una retta di taratura nella quale il punto a più bassa concentrazione avente un fattore di correlazione, con gli altri sei punti della retta, ≥ 99,995, è risultato pari a 1 µg/kg di acido perfluoroottansolfonico (PFOS) nella matrice pesce.

Come Limite di Rilevabilità si assume un valore pari a un terzo del LOQ, ovvero, 0,3 µg/kg (Tabella 8).

In assenza di segnale e/o comunque, in caso di segnali con rapporto S/N inferiore a 10, si riporta sul Rapporto di Prova il valore <LOQ (1 µg/kg).

Questo valore di LOQ è conforme alla prescrizione della Direttiva 2009/90/CE che richiede un limite di quantificazione pari o inferiore al 30 % rispetto agli standard di qualità ambientale pertinenti, pari in questo caso a 2,7 µg/kg (9,1 µg/kg x 0,3=2,7 µg/kg).

CONCLUSIONI

Sulla base di quanto complessivamente emerso nello studio sopra descritto, si possono riassumere le caratteristiche del metodo:

- Metodologia di quantificazione: Quantificazione su singolo punto;
- Campo di misura del metodo: 1 a 16 µg/kg (livelli investigati);
- Incertezza estesa per valori pari o superiori a 9.1 µg/kg (SQA): 50%;
- Incertezza estesa per valori inferiori a 9.1 µg/kg (SQA): 57 %
- Limite di Quantificazione: 1 µg/kg (livello inferiore investigato);
- Limite di ripetibilità: 20% (*).

(*) si è scelto di utilizzare un valore arrotondato in eccesso rispetto a quello ottenuto sulla base dell'esercizio interagenziale(16%), a causa della inferiore omogeneità delle aliquote di saggio di pesce intero fresco, ottenuto nelle campagne di monitoraggio, rispetto al materiale impiegato nell'esercizio in questione.

BIBLIOGRAFIA

FORMENTON G., LAVA R., CORONARO S., GALLO G., SCAMARDELLA F., GASPARELLO A., BACCELLIERE S., SALVI B., PENGO V., RAGAZZO A., SCARONI I., MONTANARI E., FORNASARI C., MORELLI M., MATTIUSSI M., DE MARTIN S., FONTANA M., CAPPA C., POLESELLO S., ANTOCI M., MAZZETTI M. (2021), "Analisi del Biota: Primo Esercizio Interconfronto tra i Laboratori delle Agenzie per l'Ambiente", Atti del 26° Convegno di Igiene Industriale sezione triveneta marzo 2021, AIDII editore, Milano, pagg. 97-100

ISPRA (2016); "Linee guida per il monitoraggio delle sostanze prioritarie (secondo D.Lgs 172/2015)" ISPRA, Manuali e linee guida 143/2016.

LINSINGER T. (2010) "Application Note 1 ERM, Comparison of a measurement result with the certified value" European Reference Material, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) January 2010.

UNICHIM (2015), "Manuale 206/1: La qualita' del dato analitico in campo ambientale - aspetti generali" Rev 2015.

US EPA (2018), "Method 537.1 2018: Determination of Selected Per- and Polyfluorinated Alkyl Substances in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)".

Appendice:

STUDIO DI QUANTIFICAZIONE DELL'ACIDO PERFLUOROOTTANSOLFONICO (PFOS) IN BIOTA (PESCE INTERO)

Questo studio è stato realizzato attraverso l'analisi di materiale di riferimento certificato IRMM 427 (*Pike Perch Muscle Homogenate: PFASs in fish tissue*: Tabella A1) che è stato analizzato nel periodo compreso tra il 7/01/2020 e il 24/02/2020 per un totale di 19 volte alternando gli operatori.

Un secondo livello di concentrazione (circa 2 µg/kg) è stato investigato attraverso la partecipazione ad un esercizio interlaboratorio interagenziale tenutosi durante l'estate del 2019 (Formenton et al., 2021).

La presente appendice descrive la metodologia impiegata per il confronto dei risultati ottenuti dalle analisi del CRM e il suo valore certificato e la scelta della metodologia di quantificazione.

Tabella A1. Valori certificati per materiale di riferimento IRMM 427.

CRM	Valore Certificato PFOS µg/kg	Incertezza µg/kg	Fattore di copertura
IRMM 427	16,0	1,7	2

A.1 Confronto dei risultati ottenuti con il valore certificato del CRM (IRMM427): metodologia

La valutazione dell'accordo tra i dati misurati e il valore certificato è stato fatto in accordo a quanto riportato in Application Note 1 ERM "*Comparison of a measurement result with the certified value*".

Viene calcolata la differenza in valore assoluto della media dei risultati ottenuti e del valore certificato secondo quanto sotto riportato:

$$\Delta_m = |C_m - C_{CRM}|$$

Dove:

Δ_m = valore assoluto della differenza tra la media dei valori misurati e il valore certificato

C_m = media dei valori misurati

C_{CRM} = valore certificato

L'incertezza di Δ_m, indicata con u_Δ, viene calcolata dall'incertezza del valore certificato e dall'incertezza del risultato di misura secondo quanto sotto riportato:

$$u_\Delta = \sqrt{u_m^2 + U_{CRM}^2}$$

Dove:

u_Δ= incertezza combinata dei risultati e del materiale di riferimento certificato (ovvero incertezza di Δ_m).

u^2_m = incertezza del risultato misurato (media) al quadrato. Come riportato in Application Note 1 ERM, la deviazione standard di riproducibili-

tà intermedia (Precisione intermedia) può essere usata per una stima di u_m nel seguente modo:

$$u_m = sd_{risultati} \div \sqrt{num.di\ misure}$$

U^2_{CRM}= incertezza standard del valore certificato (CRM) al quadrato. Nel caso dell'IRMM 427, l'incertezza standard del valore certificato viene calcolata dividendo l'incertezza riportata nel certificato per il fattore di copertura utilizzato, che risulta, nel particolare caso, pari a 2.

Da u_Δ viene calcolata l'incertezza U_Δ nella seguente maniera:

$$U_\Delta = 2 \times u_\Delta$$

Allo scopo di valutare la "performance del metodo", Δ_m è comparato con U_Δ e se:

$$\Delta_m \leq U_\Delta$$

è possibile asserire che non esistono differenze significative tra il valore certificato e la media dei valori ottenuti in condizioni di ripetibilità intermedia dal laboratorio.

A1.2 Scelta tra le modalità di quantificazione

Sono state prese in considerazione quattro diverse modalità di quantificazione:

A1.2.1 Curva in solvente

La curva in solvente è stata costruita su sette livelli con concentrazione di PFOS nativo pari a: 0,5, 1, 3, 6, 9, 15, 18 ng/mL, ^{13}C8-PFOS (standard di estrazione) pari a 1 ng/mL per tutti i livelli e 1,2,3,4^{13}C4-PFOS (standard di iniezione) pari a 3 ng/mL per tutti i livelli.

A1.2.2 Curva con soluzioni standard processate

La curva con soluzioni standard processate è stata costruita su sette livelli ponendo in tubo di prova dei quantitativi di soluzioni di nativi e di isotopicamente arricchiti misurati in modo tale da avere concentrazioni teoriche di PFOS nativo su una ipotetica aliquota di prova del peso di due grammi (2 g) pari a 0,5, 1, 3, 6, 9, 15, 18 µg/kg (es. livello 0,5 µg/kg: 5 µL di soluzione di PFAS nativi a 200 ng/mL) e di PFOS ^{13}C8 (standard di estrazione) pari a 3 µg/kg per tutti i livelli (es. per tutti i livelli : 30 µL di Soluzione di Standard di Estrazione Isotopicamente Arrichiti a 200 ng/mL).

Lo standard di iniezione 1,2,3,4^{13}C4-PFOS viene aggiunto in misura di 4.5 µL di Soluzione di Standard di Iniezione Isotopicamente Arrichiti a 200 ng/mL) per ogni 300 µL di estratto purificato in modo da ottenere una concentrazione pari a 3 ng/mL.

A1.2.3 Curva in matrice

La curva in matrice è stata costruita con un procedimento analogo a quello impiegato per la costruzione della curva con soluzioni standard processate utilizzando per ogni livello una aliquota del peso di 2 g di tessuto di pesce intero risultato sostanzialmente esente da PFOS (Aliquota di prova 6609/2019).

A1.2.4 Quantificazione su singolo punto (SIDA, Stable Isotope Diluition Analysis)

Ogni aliquota da saggio è stata addizionata di una quantità di ^{13}C8-PFOS (standard di estrazione) pari a 3 µg/kg (30 µL di Soluzione di Standard di Estrazione Isotopicamente Arrichiti a 200 ng/mL).

La quantificazione è stata eseguita secondo la seguente equazione:

$$C_x = (A_x / A_{xILS}) \times C_{xILS}$$

dove:

C_x = Concentrazione dell'analita x

A_x = Area relativa al picco dello ione quantificatore dell'analita x

A_{xILS} = Area relativa al picco dello ione quantificatore dell'analita x isotopicamente arricchito (ILS)

C_{xILS} = Concentrazione dell'analita x isotopicamente arricchito (ILS)

A1.3 Analisi di CRM (IRMM 427): Risultati (Performance del metodo e stima dell'incertezza)

I risultati ottenuti analizzando, in modalità di ripetibilità intermedia (alternanza di operatore, interventi di calibrazione sulla apparecchiatura, intervallo temporale tra le analisi superiore ai sette giorni), il materiale certificato di riferimento (Tabella A1), previamente valutati per la verifica della normalità e della assenza di "*outliers*", sono schematizzati nella Tabella A2).

Si rileva quindi che la metodica di quantificazione su singolo punto fornisce un valore medio che non presenta differenze significative dal valore certificato.

Tabella A2. Risultati dell'analisi del CRM (IRMM 427) con i diversi modi di quantificazione. Giudizio: Differenze significative tra il valore certificato e la media dei valori.

	Curva in solvente	Curva con soluzioni standard processate	Curva in matrice	Quantificazione su singolo punto
Conc. media PFOS (µg/kg)	18,8	18,3	18,8	16,7
Dev,. Standard	2,6	2,7	2,3	2,3
CV%	14%	15%	12%	14%
u_m	0,59	0,78	0,89	0,53
u_Δ	1,03	1,15	1,22	1,00
U_Δ	2,07	2,31	2,44	2,01
Δ_m	2,78	2,26	2,76	0.68
Giudizio	SI	NO	SI	NO

La performance in questione viene fornita anche dalla quantificazione con standard processato che però mostra un coefficiente di variazione percentuale superiore e una superiore complessità di esecuzione.

La determinazione del valore di bias medio e della deviazione standard dei bias consente una stima dell'incertezza del metodo al valore di concentrazione studiato (16 µg/kg) calcolabile come radice della sommatoria dei quadrati del coefficiente di variazione percentuale dei bias e di U_{Δ} in accordo a quanto riportato in UNICHIM Manuale 206/1, Rev 2015.

Risulta evidente che le incertezze calcolate appaiono dello stesso ordine (40%) dell'incertezza di Thompson per valori di concentrazione inferiori ai 110 µg/kg (44%).

Alla luce di ciò si è optato per quantificare il PFOS tramite quantificazione su punto singolo.

Tabella A3. Incertezza estesa (fattore di copertura pari a 2) calcolata per i diversi modi di quantificazione.

	Incertezza Estesa (%)
Curva in solvente	41,1
Curva con soluzioni standard processate	44,4
Curva in matrice	42,2
Quantificazione su singolo punto	38,4

A1.4 Esercizio Interagenziale: Risultati (Incertezza, limite di ripetibilità)

Il laboratorio ARPAT AVL ha partecipato all'esercizio in oggetto durante l'estate del 2019 (Codice Laboratorio: C). La quantificazione è stata eseguita applicando la metodologia denominata sopra Quantificazione a Punto Singolo.

Riguardo l'elaborazione dei risultati, i diciotto (18) dati provenienti dai laboratori partecipanti all'esercizio sono stati ordinati in modo crescente e suddivisi in tre gruppi. I dati dei laboratori D e G sono contenuti integralmente nei gruppi 1 e 3 e, poiché costituiscono le code della distribuzione complessiva, sono stati esclusi dai successivi calcoli. Il valore di consenso è stato calcolato mediando i sei (6) valori centrali ed ottenendo un valore numerico pari a 2,4 µg/kg. Il valore di z-score (0,16) del LAB C è molto soddisfacente.

Tabella A4. Risultati ottenuti dai diversi laboratori nell'esercizio di intercalibrazione.

Analita (µg/kg)	A	B	C	E
PFOS 1	2,37	1,90	2,53	2,52
PFOS 2	2,18	1,80	2,42	2,98
PFOS 3	2,38	2,20	2,56	3,65

I dodici (12) dati centrali sono stati inseriti nel modulo ARPAT n°56 (Valutazione dell'incertezza tramite approccio ibrido utilizzando i dati delle X-Chart) trattandoli come analisi ripetute del medesimo materiale di riferimento con concentrazione pari a 2,4 µg/kg e incertezza estesa pari al doppio dello scarto tipo dei sei (6) valori centrali utilizzati per il calcolo del valore di consenso. (0,2 µg/kg).

L'incertezza estesa ottenuta risulta essere pari al 57% (espressa come somma dei contributi di bias e ripetibilità interlaboratorio che, a causa della identità tra valore di consenso e media dei valori, assumono un valore sostanzialmente coincidente).

L'incertezza di ripetibilità interlaboratorio pari al 19.8% risulta in sostanziale accordo con il valore previsto da Thompson (22%) per il livello di concentrazione in esame.

Il termine $Sr/\sqrt{n}$ pari a 5,7 fornisce, se moltiplicato per un valore di t pari a 2,8, una prima stima della ripetibilità stretta che risulta essere pari a circa il 16% del valore di concentrazione esaminato.

Elaborando i dati del laboratorio ARPAT AVL, contrassegnato con la lettera C, si ottiene un valore di ripetibilità s = 19,8%.

News

Le News

rubrica a cura di ***Luigi Campanella***

Lotta alla microplastica

La lotta alla microplastica sta assumendo - e giustamente - toni ancora più impositivi di quella alla plastica. Recenti dati forniti da UE ed ONU valutano fra il 70 e l'80%delle microplastiche finite negli oceani quelle di provenienza macroplastica (bottiglie, contenitori ed altro). Il riciclo delle microplastiche è assai complicato tecnicamente e poco conveniente economicamente con le tecnologie oggi note. Un ricercatore italiano dell'università di Bolzano propone di riutilizzarle come materiale da costruzione dopo averle immobilizzate in presenza di un sale in un biopolimero, l'alginato, estremamente economico per costo, proveniente dalle alghe marine a formare un gel e poi da questo, mediante insufflazione di aria, una bioschiuma. Questa per eliminazione di acqua produce un materiale poroso. Il processo è completamente green ed il prodotto finale testato ha fornito risultati per le proprietà migliori del prodotto originario.

Gestione degli invasi

Dinnanzi alle piogge torrenziali di settembre ed alla siccità generale denunciata dai nostri agricoltori con i pericoli di incendi e di colture definitivamente spente un pensiero viene spontaneo: perché non si può utilizzare l'acqua che viene dal cielo per sopperire alle carenze di questa preziosa risorsa? Riflettendo sulla situazione della presente estate nella quale abbiamo avuto un quinto del Paese sotto il diluvio ed i rimanenti 4 quinti nella morsa dell'aridità estrema nasce evidente la necessità di moltiplicare in tutte le nostre colline e montagne un cospicuo numero di piccoli e medi invasi dedicati a trattenere l'acqua. Quanto più una risorsa è preziosa tanto più se ne rende fondamentale un uso sostenibile e sociale. Quando si affronta questo problema si finisce per parlare di risparmio, di uso intelligente dell'acqua, di sistemi di distribuzione colabrodo con conseguenti perdite di riciclo, ma difficilmente si sente parlare di raccolta dell'acqua piovana e del suo successivo impiego. Il lago artificiale usato per immagazzinare una certa quantità d'acqua è creato, di solito, attraverso la costruzione di una diga che sbarra un corso d'acqua. Quando l'invaso è localizzato in zone montuose, l'acqua è

Diga del Goillet, Breuil Cervinia, Valle d'Aosta – foto di Amelia De Lazzari https://www.snpambiente.it/wp-content/uploads/2020/08/528A19FA-5BBF-4C6A-9C59-65A2CA40CC32.jpeg

News

contenuta dai lati della valle, mentre la diga è posizionata di solito nel punto più basso e più stretto sí da minimizzare il costo di costruzione. In zone collinari gli invasi sono a volte ricavati aumentando la capacità di laghi naturali già presenti. Gli invasi possono essere ricavati anche all'interno di fiumi, in zone pianeggianti; in questo caso una parte del volume è ottenuta per escavazione e l'altra attraverso la costruzione di argini. Gli invasi possono essere realizzati per differenti scopi, quali ad esempio: idroelettrico, irriguo, di produzione di acqua potabile, di controllo delle piene (le cosiddette casse di espansione). In un invaso a scopo idroelettrico l'acqua contenuta viene convogliata attraverso un sistema di tubazioni in alcune turbine. Il sistema idroelettrico è stato alla base della nostra industrializzazione tanto da rappresentare il 90% dell'elettricità nel periodo di boom economico. Oggi vale molto di meno, circa il 20%, per motivi diversi: invecchiamento degli impianti, nuove forme di energia, incertezze normative. In corrispondenza di una caduta dei grandi invasi, a partire da ENEL, c'è invece una crescita dei piccoli basati su corsi di fiumi e torrenti che forse meritano una maggiore attenzione e per i quali è auspicabile un sostegno nell'ambito de PNRR (Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza). La loro modesta potenza non risolve certamente il problema dell'energia pulita, ma ne permette uno sviluppo con investimenti che necessitano di contributi meno rilevanti di quelli degli impianti eolici. Siamo giustamente preoccupati per gli andamenti climatici sempre più estremi e sempre più altrettanto giustamente si invocano cambiamenti di stili di vita, ma si dimenticano una seria di altri importanti azioni. Quella sugli invasi è una di queste eppure se correttamente sviluppata potrebbe rappresentare una efficace difesa. Un problema può essere rappresentato dalla recente liberalizzazione del settore adottata nel nostro Paese e dalla contemporanea norma sulla riduzione dei tempi delle concessioni che sconsigliano gli attuali acquirenti, Regioni incluse: questo significa puntare su imprese straniere che vogliano investire. Infine c'è il problema dell'abbandono delle campagne e delle colline proprio per l'assenza di una politica di sostegno anche relativa agli invasi: oggi le cause di quelle fughe sono anche ascrivibili all'abbandono degli invasi che ha portato ad una drammatica riduzione della produttività agricola. La mancanza d'acqua è la prima causa della morte della nostra montagna e della nostra collina.

Rimanendo al tema acqua voglio segnalare la moltiplicazione delle indicazioni "acqua non potabile" che ho personalmente rilevato anche lungo sentieri di montagna che di certo non possono giustificare tale raccomandazione. La burocrazia e le incertezze normative sulle responsabilità spingono gli amministratori locali verso una condotta di deresponsabilizzazione: meglio un cartello che procedere a controlli adeguati!

News

Ciclo dell'acqua e Cambiamenti Climatici

Il ciclo dell'acqua e fondamentale per la Terra e per la nostra vita quotidiana. I cambiamenti climatici però lo stanno modificando in maniera imprevista. L'Università del Galles del Sud a Sydney in Australia ha pubblicato su Nature uno studio secondo cui dal 1970 ad oggi si è spostata dall'equatore ai poli una quantità di acqua dolce circa 2-4 volte superiore a quanto ipotizzato sulla base di modelli climatici attualmente in uso. Si tratta del primo dato quantitativo sul fenomeno. Il ciclo dell'acqua che rende fertile ed abitabile la terra e possibile la vita di tutti gli ecosistemi consiste nel trasporto di acqua dolce tra la superficie terrestre, i bacini d'acqua e le nuvole grazie ai 2 processi a carico dell'acqua, evaporazione e precipitazione. Il ciclo dell'acqua è correlato doppiamente ai cambiamenti climatici In quanto ne è influenzato e li influenza L'aumento delle temperature ha allontanato l'acqua dalle regioni aride intensificando inondazioni ed eventi piovosi nelle regioni umide. Capire come il ciclo dell'acqua risponda ai cambiamenti climatici può risultare determinante per mitigare l'impatto di tali cambiamenti Ma studiare il ciclo dell'acqua è molto difficile, perché una parte significativa dei fenomeni (evaporazione e precipitazioni) avviene negli oceani dove le osservazioni dirette sono difficili. I ricercatori australiani a cui facevo riferimento all'inizio hanno perciò cercato strategie alternative e le hanno trovate nel tasso di salinità delle varie zone oceaniche. Nelle regioni calde l'evaporazione provoca un aumento della salinità mentre l'acqua evaporata condensa nei climi più freddi diluendo gli oceani ed abbassandone il grado di salinità. Misurando questi dati si possono avere stime della portata del ciclo dell'acqua e rivelarne anche i cambiamenti nel tempo. Dai dati analizzati dai ricercatori e riferiti al periodo 1970–2014 è stato così possibile concludere che tutti i 20 modelli climatici di confronto esaminati sottostimavano la componente di variazione del ciclo dell'acqua dovuta al riscaldamento globale.

Sardegna – foto di Giuliano Saiu https://www.snpambiente.it/wp-content/uploads/2020/09/1683-Saiu.jpg

News

I primi 40 anni del Notiziario dei Metodi Analitici per le Acque

a cura di

Luigi Campanella e Stefano Polesello

Nel gennaio del 1981 venne pubblicato il numero 1 del Notiziario dei Metodi Analitici per le Acque con un articolo intitolato "Rassegna e considerazioni sui metodi di analisi dei fluoruri nelle acque" a firma del prof. Luigi Campanella dell'Istituto di chimica analitica dell'Università della Sapienza di Roma e del dott. Riccardo Sbrilli del Laboratorio di trattamento dei minerali del CNR di Roma.

Questo articolo inaugura una serie molto lunga di contributi sullo sviluppo dei metodi analitici che corre in parallelo all'introduzione della legislazione italiana ed europea sulle acque che vengono pubblicati su questa rivista. Questa rivista diviene nel corso degli anni il luogo dove vengono presentati, discussi e condivisi nuovi approcci metodologici per l'analisi delle acque e la protezione degli ecosistemi, in modo da fornire poi metodi già predisposti per l'inserimento nelle edizioni successive dei Manuali dei Metodi Analitici per le Acque. Per diversi numeri, dal 1982, è disponibile al termine della rivista l'Indice Generale del Manuale sui Metodi Analitici per le Acque aggiornato. A questa prima fase legata all'implementazione della cosiddetta Legge Merli (Legge 319/1976), nella quale il focus è prevalentemente sui metodi di analisi chimica, in particolare inorganica, fa seguito una fase di allargamento delle metodiche che include oltre alle tecniche cromatografiche, metodologie per la definizione della tossicità delle acque basate su test standardizzati su organismi viventi. L'introduzione della Direttiva Quadro sulle Acque (Water Framework Directive 2000/60/CE), e il suo recepimento nel D.Lgs 152/2006, hanno reso necessario un approccio integrato e multidisciplinare della protezione degli ecosistemi acquatici, che si trova riflesso nell'ampliamento delle tematiche trattate dal Notiziario.

Tutti i numeri della rivista, sia pubblicati in forma cartacea sia elettronica, sono disponibili nel sito dell'Istituto di Ricerca sulle Acque (http://www.irsa.cnr.it/Notiziario).

In occasione dei 40 anni di questa rivista abbiamo chiesto al prof. Campanella, coautore del primo articolo e da allora componente del Comitato Editoriale della rivista un contributo che ripercorresse l'evoluzione dei metodi analitici alla luce dell'evoluzione della normativa riflessa negli articoli pubblicati nella rivista, con la collaborazione del dott. Polesello, attuale Direttore Scientifico della rivista.

L'acqua è una risorsa essenziale per la vita dell'uomo. Essa è fondamentale non soltanto per la sopravvivenza stessa, ma anche per attività quali l'agricoltura e l'industria. Senza di essa difficilmente vi può essere sviluppo e il mantenimento delle risorse idriche è sicuramente uno dei problemi decisivi per la società. Tali risorse sono soggette a un deterioramento dovuto a molti fattori, tra i quali gli scarichi industriali, spesso ricchi di sostanze chimiche dannose per l'ecosi-

News

stema in cui vengono immesse, l'utilizzo di pesticidi e nitrati nell'agricoltura, che contaminano il suolo e le falde acquifere sottostanti, l'inquinamento atmosferico sempre più consistente che viene poi riportato al suolo e nelle acque dalle deposizioni umide. È pertanto necessario definire degli indici di qualità dell'acqua, e mettere a punto metodi che siano in grado di valutare i rischi di un suo possibile uso a fini umani, a partire dalla potabilità dell'acqua. Ciò richiede un monitoraggio accurato ed affidabile delle acque, e dei processi di risanamento. È innanzitutto necessario definire quando un'acqua può essere ritenuta utilizzabile per l'uomo fino alla sua potabilità. Allo stato attuale, si può parlare di potabilità legislativa: infatti la definizione corrente di potabilità è riferita ad alcune tabelle ed a vari decreti legislativi sulla qualità delle acque destinate al consumo umano, in cui vengono indicate le concentrazioni massime di sostanze inquinanti e ritenute tossiche per l'uomo. Ovviamente tale approccio non considera gli effetti dovuti a possibili correlazioni e sinergismi fra i vari inquinanti. Lo stesso discorso con altri limiti si estende agli altri usi (igienico sanitari, domestici, raffreddamento, ecc..). Tutta questa problematica negli anni '70 ha portato ad un acceso dibattito nella comunità scientifica trasferito a quella politica all'interno della quale l'on. Merli si fece promotore di una legge (Legge 319/1976) che stabiliva limiti e metodi di controllo affidando all'IRSA CNR la definizione di un Manuale dei Metodi Analitici per l'analisi delle Acque. Tale Manuale pubblicato la prima volta nel 1972 (ISBN 88-448-0083-7) rappresenta il risultato di un'attività di revisione periodica ed armonizzazione dei metodi analitici per la caratterizzazione fisica, chimica, biologica e microbiologica delle acque. Nel 1999 l'APAT ha partecipato alla revisione del Manuale dopo l'attivazione di una convenzione col CNR che attesta l'impegno alla continuazione di un lavoro di integrazione dei Metodi Analitici per le Acque, richiesti dalla normativa, ma non ancora presenti nel manuale. L'Opera è articolata in 3 volumi suddivisi in sezioni e capitoli. I 3 volumi sono dedicati a Parte Generale, parametri Chimico Fisici e Metalli (vol. 1), a Inorganici non metalli (vol. 2), a Metodi microbiologici ed ecotossicologici ed Indicatori Biologici (vol. 3). Per ogni indice il Manuale riporta un protocollo analitico a partire dal campionamento per procedere alla scelta del metodo analitico, all'analisi vera e propria ed alla trattazione dei risultati sperimentali ottenuti per ricavare il valore richiesto ai fini del confronto con i valori limite. Alcune delle preziose caratterizzazioni presenti nel Manuale riguardano l'introduzione del concetto di qualità, la definizione di protocolli analitici per differenti metodi (ottici cromatografici, elettrochimici), la definizione dei protocolli per l'analisi di microorganismi, i saggi di tossicità cronica ed acuta. Circa i metodi proposti per i vari indici si tenne conto nella stesura

News

della prima edizione delle disponibilità a quel tempo da parte dei laboratori di analisi e controllo: proprio in relazione alla generale disponibilità di spettrofotometri si cercò di prevedere sempre almeno una alternativa sperimentale di tipo spettrofotometrico.

Con gli aggiornamenti del Manuale lo stesso tipo di logica fu applicato ai metodi per assorbimento atomico. Durante la vita del Manuale sono stati programmate nel tempo dei veri e propri *brainstorming* su specifici argomenti per pervenire a metodi sempre più accurati, ma anche disponibili e per guidare i tecnici nelle analisi descritte nel Manuale. Impossibile ricordare tutti questi workshop, ma ne voglio citare uno dedicato al campionamento per il grande successo che a quel tempo ottenne e che per la sua importanza, anziché essere coordinato da uno dei membri del C.S. di ISPRA, fu diretto dall'allora Direttore IRSA, prof. Roberto Passino. Campionamento può definirsi come l'operazione di prelevamento della parte di una sostanza di dimensioni tali che le proprietà misurate sul campione prelevato rappresentino, entro un limite accettabile noto, la stessa proprietà nella massa di origine. In altre parole -si disse e scrisse allora- il fine ultimo del campionamento ambientale è quello di consentire la raccolta di porzioni rappresentative della matrice che si vuole sottoporre ad analisi. Il campionamento costituisce quindi la prima fase di ogni procedimento analitico che porta a risultati la cui qualità è strettamente correlata a quella di prelievo del campione analizzato. Per tale motivo il campionamento è una fase estremamente complessa e delicata che condiziona i risultati di tutte le operazioni successive e che di conseguenza incide in misura non trascurabile sull'incertezza totale dei risultati dell'analisi. In quel workshop furono riportati anche i risultati di una ricerca bibliografica che mettevano in evidenza come l'incertezza associata al campionamento può contribuire dal 30 al 50% all'incertezza associata al risultato analitico finale ed è molto più determinante rispetto all'incertezza associata alla fase Analitica vera e propria che in media vale intorno al 5%. Molte fonti di incertezza possono influire sui risultati di analisi ambientali, ma il campionamento, anche con gli appositi dispositivi prodotti per esso nel tempo, resta un punto critico.

Nel tempo l'analisi delle acque si è aggiornata in tema di nuove problematiche, nuovi indici, nuovi metodi. Per quanto riguarda i problemi uno che di certo ha attirato l'attenzione della comunità scientifica dedicata ed a cui già prima si accennava è quello degli effetti sinergici di inquinanti diversi. Premesso che la rispondenza ai limiti legislativi è condizione non sufficiente per definire la rispondenza ai limiti di legge in presenza di sinergismi, come si può rappresentare la funzione diagnostica? Inizialmente si era pensato ad un *look-up table*: sarebbe però stato necessario memorizzare milioni di dati ed eseguire un numero molto elevato di prove per tenere conto delle eventuali sinergie e degli eventuali antagonismi. Oggi le tecnologie informatiche con differenti strumenti messi a disposizione a partire dalle reti neurali e dal teorema di approssimazione universale che ci garantisce che una rete neurale se opportunamente dimensionata è in grado di approssimare una qualsiasi funzione non lineare, hanno consentito di concretizzare passi in avanti anche nel caso di valutare possibili sinergie ed antagonismi fra effetti imputabili a specie diverse. È stato dimostrato ad esempio che la regione di potabilità è rappresentata da una funzione complessa riproducibile da una rete neurale addestrata. Circa i nuovi indi-

News

ci questi derivano dagli inquinanti di nuova generazione (elettronici, farmaci, plastiche…) rispetto ai quali non sono mancati nel tempo puntuali richiami all'attenzione da parte dell'UE.

L'introduzione e l'implementazione della Direttiva Quadro sulle Acque (Water Framework Directive 2000/60/CE), e il suo recepimento nel D.Lgs 152/2006, ha ribaltato il concetto di protezione degli ecosistemi acquatici. La qualità di un corpo idrico non è più valutata sul semplice rispetto di una serie di limiti di sostanze chimiche, ma sul mantenimento di condizioni chimiche, fisiche, biologiche ed ecologiche che rendano possibile il mantenimento di ecosistemi il più possibili simili a quelli presenti in corpi idrici privi di pressioni di origine antropica. Questo ha creato la necessità di sviluppare ed introdurre nuove metodologie di indagine e classificazione dei corpi idrici, testimoniate ad esempio dai fondamentali contributi dei ricercatori IRSA pubblicati nel numero speciale dei Notiziari nel 2008, dedicato alle "Condizioni di riferimento per fiumi e laghi" e alla "Classificazione dei fiumi sulla base dei macroinvertebrati acquatici". I testi qui pubblicati sono divenuti riferimenti normativi vincolanti citati nei decreti di recepimento della Direttiva Quadro sulle Acque.

Per quanto riguarda le nuove metodiche analitiche chimiche, l'introduzione delle tecniche di spettrometria di massa accoppiate alla cromatografia liquida e gassosa ha ampliato il campo delle famiglie di sostanze analizzabili, includendo i contaminanti cosiddetti emergenti, tra i quali sono presenti molte sostanze polari (es. farmaci, tensioattivi e prodotti per la cura della persona) utilizzate ed emesse da tutti noi nella nostra vita quotidiana. Molto importante in questo campo è stato il contributo del sistema delle Agenzie di Protezione Ambientale regionali, che hanno spesso condiviso i metodi interni pubblicandoli sulla nostra rivista. Molti di questi metodi sono stati la base per metodi di analisi ufficiali pubblicati nel Rapporto ISTISAN 19/7 - Metodi analitici per il controllo delle acque da destinare e destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 e s.m.i. Metodi chimici. Questo dimostra che anche dopo 40 anni la nostra rivista mantiene un ruolo importante nella condivisione e sviluppo delle attività di implementazione della legislazione sulla protezione delle acque in Italia. Il passaggio inevitabile nel 2015 da pubblicazione cartacea a pubblicazione solo on-line con un titolo leggermente rivisto "Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA-New" ha permesso di ampliare la diffusione della rivista e ha aperto una nuova stagione di contributi su tutti campi della gestione delle acque.

News

Incontri telematici organizzati dall'Istituto di Ricerca sulle acque (IRSA-CNR)

L'IRSA CNR propone una serie di incontri telematici volti a condividere le proprie attività di ricerca ed ospitare colleghi della rete scientifica nazionale ed internazionale. Gli incontri sono stati attivati in modalità telematica data l'eccezionalità degli avvenimenti legati all'emergenza epidemiologica "COVID-19" e la conseguente impossibilità a svolgere i seminari in presenza nelle diverse sedi IRSA.

Gli incontri telematici sono organizzati dal Gruppo di Lavoro Seminari IRSA, costituito nel 2020 e composto dai colleghi IRSA Raffaella Balestrini, Marco Berardi, Carolina Cruz Viggi, Magda Di Leo, Francesca Di Pippo, Diego Fontaneto e Domenica Mosca Angelucci.

Gli incontri telematici sono aperti a tutti, si svolgono su piattaforma GoToMeeting ed è necessaria la registrazione.

La lista degli eventi IRSA è raggiungibile al link https://eventi.irsa.cnr.it/ dove si possono trovare tutte le informazioni per la registrazione e gli aggiornamenti del programma.

Gli incontri telematici organizzati dall'IRSA sono inoltre disponibili on-line sulla piattaforma Tube@CNR, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, all'indirizzo https://tube.rsi.cnr.it/a/irsa.

https://eventi.irsa.cnr.it/

L'attività del GdL Seminari IRSA dal 2020 ad oggi ha riguardato l'organizzazione di seminari tematici tenuti da ricercatori IRSA, personale in formazione e ospiti di istituzioni scientifiche con cui l'Istituto collabora.

Sono stati inoltre organizzati due workshop tematici: 1) "Economia circolare: Ricerca e Innovazione"; 2) "Siti contaminati: caratterizzazione, monitoraggio e tecnologie di risanamento".

Il workshop online "*Economia circolare: Ricerca e Innovazione*" si è tenuto il 14 Aprile 2021 ed ha coinvolto 8 ricercatori IRSA e 2 relatori esterni su invito (Dott.ssa Grazia Barberio – ENEA; Prof. Mauro Majone – Sapienza Università di Roma). Lo scopo del workshop è stato quello di evidenziare il ruolo dell'innovazione tecnologica e della ricerca nel settore dell'economia circolare, dando rilievo alle competenze multidisciplinari presenti nel nostro Istituto e alle collaborazioni con professionalità esterne. L'evento ha fornito l'occasione per confrontarsi sulle tecnologie sviluppate, per valutare le possibili applicazioni/collaborazioni e le opportunità di mercato insieme a PMI innovative presenti sul territorio. Il workshop è stato strutturato nelle seguenti sessioni: 1) Tecnologie al servizio dell'economia circolare; 2) Recupero e riutilizzo delle risorse nell'ottica della circolarità. Il workshop ha visto la partecipazione di circa 200 persone tra ricercatori e personale in formazione di IRSA, altri EPR e Università, rappresentanti di PMI e liberi professionisti.

Il workshop online "*Siti contaminati: caratterizzazione, monitoraggio e tecnologie di risanamento*" si è tenuto il 26 – 27 Gennaio 2022 ed ha visto la partecipazione di 13 ricercatori IRSA e 3 relatori esterni su invito (Dott. Marco Falconi – ISPRA; Prof. Marco Petrangeli Papini – Sapienza Università di Roma; Prof. Rajandrea Sethi – Politecnico di Torino). Il workshop ha avuto lo scopo di evidenziare il ruolo della ricerca e dell'in-

News

novazione tecnologica nel settore della bonifica dei siti contaminati, focalizzandosi sui sistemi più avanzati di monitoraggio e caratterizzazione di siti contaminati finalizzati alla selezione e alla progettazione di tecnologie innovative e sostenibili per il risanamento di suoli, falde acquifere e sedimenti contaminati. L'evento ha fornito ai ricercatori IRSA l'occasione per confrontarsi sulle tecnologie sviluppate e per valutare possibili collaborazioni/ applicazioni con ricercatori di altre istituzioni e/o operatori del settore. Il workshop è stato strutturato in due sessioni: 1) Caratterizzazione e monitoraggio dei siti contaminati; 2) Sviluppo di tecnologie innovative di risanamento dei siti contaminati. Il workshop ha visto la partecipazione di circa 220 persone tra ricercatori e personale in formazione di IRSA, altri EPR e Università, rappresentanti di PMI e liberi professionisti.

Attualmente è in preparazione un evento per la Giornata mondiale dell'acqua (22 marzo 2022) secondo la seguente tematica "Acque sotterranee: gestione, interazione con gli ecosistemi, processi e tecnologie di trattamento".

A cura di:

Gruppo di Lavoro Seminari – Istituto di Ricerca sulle Acque, gdl_seminari@irsa.cnr.it.

News

Nuovi Materiali

Potenzialità del grafene nei trattamenti delle acque destinate al consumo umano

Il PROGETTO GRAPHIL

L'utilizzo di nanomateriali nei trattamenti delle acque suscita un grande interesse per la loro enorme potenzialità. Tra i più innovativi c'è il grafene, un materiale costituito da un monostrato di atomi di carbonio con eccezionali proprietà adsorbenti rispetto diverse classi di contaminanti (microinquinanti organici emergenti e metalli pesanti) in aggiunta al suo potenziale effetto battericida/batteriostatico. Come spesso succede, la possibilità di utilizzare commercialmente un nanomateriale nel trattamento delle acque, risiede spesso nella scelta idonea di un supporto che ne mantenga le proprietà ma ne eviti la dispersione nell'acqua trattata al fine di evitare danni alla salute ed all'ambiente.

In questo contesto nasce il Progetto Graphil (2020-2022), coordinato da Medica S.p.a. di cui il CNR è partner con 2 Istituti: Istituto della Sintesi Organica e Fotoreattività (ISOF) e Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA).

Il progetto Graphil è stato finanziato da EU-2020 ed è parte del *Graphene Flagship Core 3*. Questo gruppo della *Graphene Flagship* si occupa di assicurare un ruolo predominante all'Europa nella rivoluzione tecnologica, in modo particolare stimolando a portare le innovazioni legate all'uso del grafene fuori dal laboratorio alla conquista del mercato, dando loro soluzioni commerciali di pronto utilizzo. Più di 160 istituzioni accademiche e 23 partner industrial partecipano infatti alla realizzazione del Core 3.

L'obiettivo principale di Graphil è la produzione e commercializzazione di filtri innovativi e sicuri, basati su grafene o materiali modificati con grafene, per il trattamento di acque potabili in un contesto domestico (Filtri al Punto di Utilizzo sotto al lavello) o di filtri portatili per purificare le acque da bere in un contesto emergenziale.

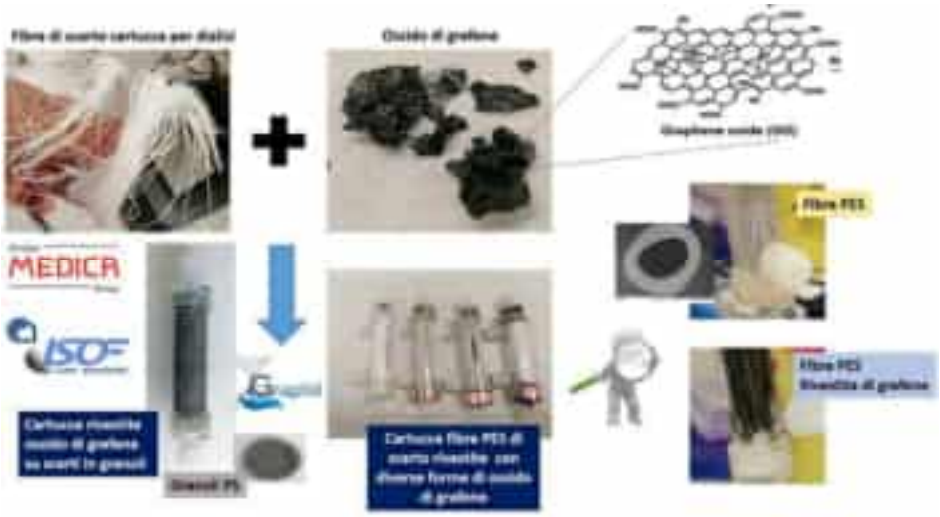
Nel campo delle acque destinate al consumo umano è stata da poco introdotta una nuova Direttiva Europea (EU/2020/2184) in sostituzione della 2001/31/EC dove nuovi contaminanti di interesse sono stati inseriti e diversi limiti sono stati rivisti. La possibilità di funzionalizzare il grafe-

Progetto Graphil: consorzio e sommario delle attività per la commercializzazione di filtri destinati al trattamento di acque per il consumo umano

News

ne al fine di estenderne la capacità di rimuovere diverse classi di contaminanti a diversa polarità e natura (organica/inorganica), lo rende un materiale altamente versatile da poter applicare con successo in una filtrazione del tipo *one-step* senza trattamenti ulteriori.

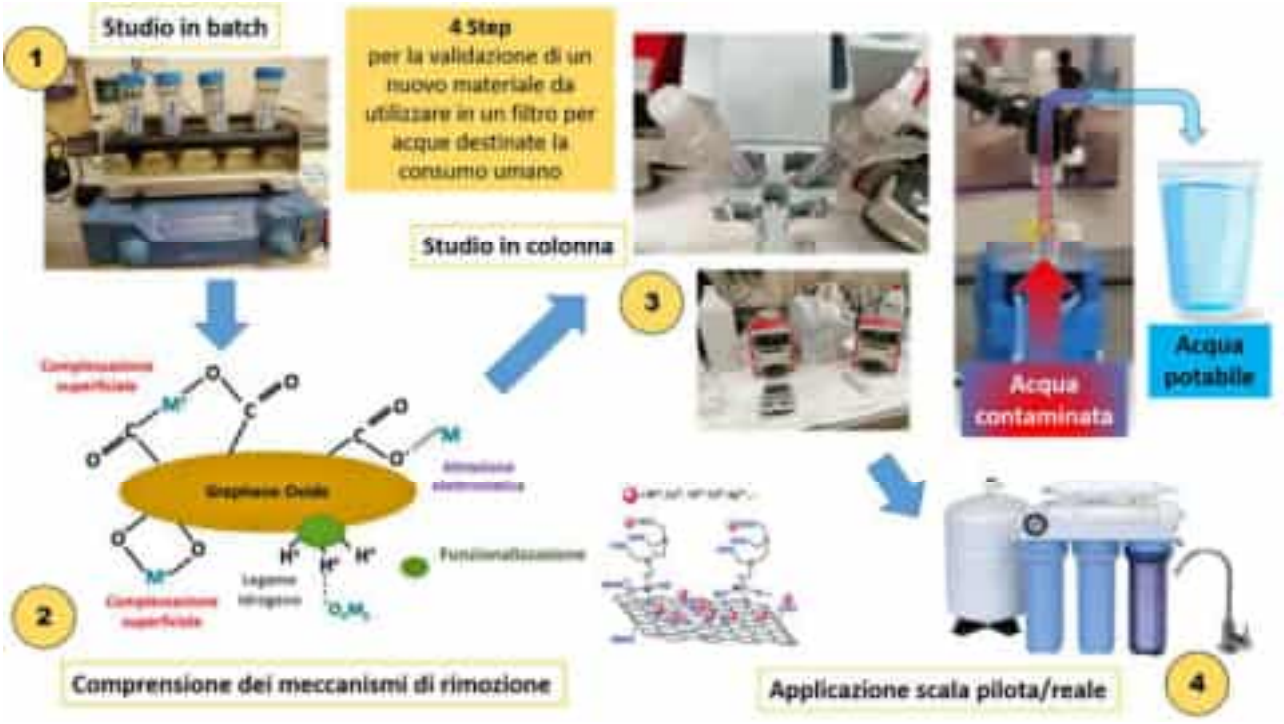
Progetto Graphil: la preparazione dei filtri da testare



Nell'ambito del progetto Graphil sono stati realizzati filtri in cui il grafene è stato inserito come nanomateriale in aggiunta alla soluzione polimerica utilizzata per estrudere la membrana a fibra capillare cava in polisulfone (membrana da ultrafiltrazione) al fine di ottenere una fibra con un'elevata area superficiale e maggior numero di ossigeni sulla superficie che facilitano l'attrazione di contaminanti.

In una seconda fase mediante test in laboratorio si mira a comprendere le capacità di rimozione dei filtri in diverse condizioni (matrici differenti, *range* di pH, copresenza di contaminanti, % e caratteristiche del grafene contenuto) ed i possibili meccanismi di reazione che promuovono la rimozione di differenti contaminanti. Si passa poi allo studio in condizioni dinamiche su piccola scala

Progetto Graphil: Dallo studio di laboratorio ad un impianto su scala reale



News

(colonne) per capire le proprietà del materiale in condizioni operative variabili (portata, geometria dei filtri, pressioni sviluppate, rilascio contaminanti ed eventuale formazione di biofilm patogeno). Una volta ottimizzati i filtri in scala di laboratorio si procede alla realizzazione di un sistema pilota per definire gli ultimi aspetti necessari alla commercializzazione del filtro.

Per maggiori informazioni:

Barbara Casentini

Barbara.casentini@irsa.cnr.it

Video Progetto Graphil

https://www.medica.it/en/progetti/graphil

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE PROGETTO GRAPHIL

"Defective graphene nanosheets for drinking water purification: Adsorption mechanism, performance, and recovery" S Khaliha, TD Marforio, A Kovtun, S Mantovani,..., M Melucci - FlatChem, 2021, 29, p. 100283. DOI: 10.1016/j.flatc.2021.100283

"Core–shell graphene oxide–polymer hollow fibers as water filters with enhanced performance and selectivity" A Kovtun, A Bianchi, M Zambianchi, C Bettini,..., M Melucci - Faraday Discussions, 2021, 227, pp274-290. DOI: 10.1039/C9FD00117D

"Scalable synthesis and purification of functionalized graphene nanosheets for water remediation" S Mantovani, S Khaliha, L Favaretto, C Bettini,..., M Melucci - Chemical Communications, 2021, 57, 31, pp. 3765-3768 DOI: 10.1039/D1CC00704A

"Multifunctional graphene oxide/biopolymer composite aerogels for microcontaminants removal from drinking water" A Kovtun, E Campodoni, L Favaretto, M Zambianchi,..., M Melucci - Chemosphere, 2020, 259, p 127501 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127501

News

Microinquinanti organici normati ed emergenti negli ecosistemi artici: un viaggio dalle regioni temperate a quelle polari in uno scenario di cambiamento climatico

Il cambiamento climatico nelle regioni artiche e sub-artiche sta avvenendo con più rapidità che altrove, un fenomeno che viene definito “Amplificazione artica" e che si manifesta con un riscaldamento pari a più del doppio rispetto alla media globale, riduzione dello spessore e della copertura del ghiaccio marino, diminuzione dell’estensione e della durata del manto nevoso, scioglimento del permafrost e acidificazione degli oceani.

Questi fenomeni stanno innescando, a scala regionale, effetti sulla struttura e funzione degli ecosistemi artici e sui cicli biogeochimici. Molte delle conseguenze di tali cambiamenti sugli ecosistemi devono ancora essere comprese. A causa dell’estrema variabilità stagionale della radiazione solare, delle basse temperature e delle brevi stagioni di crescita, le regioni polari risultano, inoltre, particolarmente sensibili alla contaminazione ambientale. Molti xenobiotici possono essere trasportati dalle sorgenti di emissione (generalmente medie latitudini) alle regioni artiche attraverso le correnti marine (compresi i contaminanti intrappolati nel ghiaccio marino durante il processo di congelamento), i fiumi, la circolazione atmosferica e gli animali migratori.

Kongsfjorden (Ny-Alesund, Svalbard, Norvegia)

Le regioni polari rappresentano di fatto il “serbatoio globale” di inquinanti persistenti, in quanto agiscono come “trappola fredda” favorendone il deposito sul comparto terrestre e acquatico. La loro migrazione verso latitudini più elevate non avviene in un solo *step*, ma tramite una serie di cicli successivi di evaporazione e deposizione, il cosiddetto “effetto cavalletta”, che dipende dalle variazioni stagionali della temperatura. L’effetto finale, contrariamente a quanto si potrebbe pensare, è che la concentrazione di questi inquinanti cresce all’aumentare della distanza dalla fonte di emissione per la tendenza a migrare più facilmente verso temperature più fredde. Per questo le regioni polari diventano zone indicatrici della contaminazione. Il cambiamento climatico sta rendendo nuovamente attuale questo fenomeno ben noto, in quanto l’aumento delle temperature sta provocando il rilascio nell’ecosistema acquatico e terrestre di contaminanti, soprattutto dei «vecchi» POPs (*Persistent Organic Pollutants*) intrappolati nel ghiaccio, nella neve e nel permafrost, quella che viene definita “emissione secondaria”. Ciò ha comportato un trend in crescita degli apporti di contaminanti nel comparto acquatico, inclusi quelli già banditi dall’uso da molti anni, con ripercussioni anche sulla sfera biologica. Un’ulteriore conseguenza del cambiamento climatico deriva dall’aumento delle attività antropiche nelle aree remote (ad es. turismo, pesca etc.) rappresentando, di fatto, una fonte locale di contaminazione in continua crescita.

Il Programma di Monitoraggio e Valutazione dell'Artico (AMAP) ha indicato che il rischio dovuto alla presenza di POPs, mercurio e inquinanti chimici emergenti (i cosiddetti CEAC, *Chemicals of Emerging Arctic Concern*) al Polo Nord è ancora molto elevato. Mentre le conoscenze su presenza ed

News

effetti dei POPs negli ecosistemi artici sono cresciute negli ultimi anni, lo stesso non può dirsi per i CEAC. Nonostante abbiano vita più breve rispetto ai POPs, il continuo rilascio di CEAC dalle comunità settentrionali e la loro lenta degradazione a seguito delle temperature più fredde e delle ridotte condizioni di luce solare, congiuntamente all'esposizione cronica, potrebbero avere un impatto sugli ecosistemi e sulle popolazioni locali. L'effetto complessivo di questi molteplici fattori di stress sull'ecosistema artico è davvero poco conosciuto e la rapidità dei cambiamenti ambientali richiede una pronta risposta da parte della comunità scientifica.

Campionamento di acqua marina del Kongsfjorden (Ny-Alesund, Svalbard, Norvegia)

In tale contesto, il gruppo di ricerca sui microinquinanti organici dell'Istituto di Scienze Polari (ISP-CNR, sede secondaria di Roma), nell'ambito del Programma di Accesso Transnazionale Europeo INTERACT, del Programma di Ricerca in Artico (PRA) e delle attività di ricerca alle Svalbard (*Research In Svalbard*-RIS) coordinate dallo *Svalbard Science Forum* (SSF, Norvegia), sta conducendo studi focalizzati a comprendere gli effetti ecologici legati ai cambiamenti climatici e alle pressioni antropogeniche, come l'esposizione ai contaminanti, sia negli ecosistemi marini artici (Svalbard-Norvegia e Groenlandia) sia in fiumi sub-artici (fiume Pasvik, Norvegia; fiume Teno, Finlandia; fiume Lena, Russia). L'obiettivo di questi studi è di contribuire, attraverso un approccio multidisciplinare (chimica ambientale, ecologia, oceanografia, telerilevamento), alla valutazione dello stato di salute ambientale di questi ecosistemi e dell'impatto in termini di presenza, diffusione e destino ambientale di contaminanti emergenti (tra cui residui farmaceutici e antibiotici, prodotti per la cura personale, pesticidi di nuova generazione, micro/nanoplastiche, etc.) su di essi. Valutando, inoltre, la risposta biologica alla contaminazione e ai cambiamenti climatici in corso a diverse scale, dalla comunità microbica agli organismi bentonici, ai pesci. I risultati di queste indagini, in parte pubblicati, altri ancora in corso di elaborazione, forniranno una valutazione integrata e aggiornata dello stato di alterazione degli ecosistemi artici, concentrandosi sugli effetti di vecchi e nuovi contaminanti sul comparto acquatico e sulla rete trofica, valutando come la diffusione della contaminazione e la ri-emissione degli inquinanti intrappolati nel ghiaccio possano influenzare l'adattamento e sopravvivenza degli organismi.

Tali aspetti sono cruciali per comprendere come l'ecosistema artico risponderà al cambiamento globale e all'inquinamento, in vista di una gestione sostenibile di questi ambienti vulnerabili nel prossimo futuro (ad es. nuove rotte di navigazione o più aree prive di ghiaccio per lo sviluppo degli insediamenti umani).

Luisa Patrolecco,
Istituto di Scienze Polari (ISP-CNR, Roma)

News

LIFEPLAN, un progetto per l'inventario globale della biodiversità

Gli studi più recenti stimano che l'80% di tutte le specie presenti sulla Terra sia ancora sconosciuto. Al contempo, la perdita di biodiversità sta procedendo velocemente, portando quindi alla scomparsa di organismi viventi ancora da scoprire. La conoscenza della biodiversità è perciò di fondamentale importanza sia per valorizzarla sia per consentirne la tutela in maniera appropriata e mirata.

In questo contesto, il CNR-IRSA di Verbania partecipa al progetto LIFEPLAN, un ambizioso programma internazionale che mira a stabilire lo stato attuale della biodiversità in tutto il mondo e a utilizzare questi dati per prevederne i futuri scenari. Il progetto LIFEPLAN punta a caratterizzare la diversità biologica attraverso un programma di campionamento a scala mondiale, sviluppando approcci bioinformatici e statistici necessari per sfruttare al meglio i *Big Ecological Data* che verranno prodotti. Metodi di campionamento moderni che non richiedono competenze tassonomiche da parte di chi effettua la raccolta, permettono di avere dati comparabili tra diverse località sparse per tutto il mondo.

Il progetto si articola in sei anni, dal 2020 al 2025, ed è finanziato dal Consiglio Europeo della Ricerca nell'ambito del Programma di Ricerca ed Innovazione Horizon 2020 (Grant Agreement N. 856506). LIFEPLAN è coordinato dall'Università di Helsinki (Finlandia) ma coinvolge più di 100 località sparse in tutto il mondo. Il progetto prevede di campionare alternativamente per un anno un sito urbano e uno naturale, situati abbastanza vicini tra loro da avere caratteristiche climatiche e geografiche simili.

News

Nel sito vengono settimanalmente raccolti dati, utilizzando tecniche diverse e complementari. Da una parte si ha il campionamento audio, in modo da registrare suoni provenienti da uccelli e ultrasuoni da pipistrelli, e un campionamento video tramite fototrappole, per registrare la macrofauna. Attraverso lo sviluppo di sistemi bioinformatici e statistici, verranno analizzati i tracciati audio e le immagini catturate per caratterizzare la fauna. A queste due metodiche sono stati affiancati il campionamento fisico di esemplari di insetti tramite trappola malaise, di pollini e spore tramite *cyclon sampler*, e di suolo tramite campionamento manuale. Tutti i campioni così ottenuti vengono spediti ai coordinatori del progetto che provvedono a caratterizzare a livello molecolare gli organismi raccolti. Nel complesso queste tecniche danno una visione completa della diversità biologica e delle sue variazioni in ognuno dei siti coinvolti.

Il CNR-IRSA di Verbania è entrato da subito nel progetto, risultando essere uno dei due siti italiani presenti in LIFEPLAN. L'altro sito italiano è situato a Marina di Petacciato (CB) e gestito da EnvixLab del Dipartimento di Bioscienze e Territorio dell'Università del Molise.

Per il primo anno si è deciso di partire con il sito in ambiente urbano, individuando nella Villa Taranto di Verbania (Ente giardini botanici) il luogo ideale come sito urbano per il progetto. Grazie alla collaborazione del direttore e dei dipendenti è stato possibile installare tutte le apparecchiature necessarie al campionamento. Con la fine dell'anno siamo arrivati anche alla conclusione del primo anno, in cui siamo riusciti a raccogliere dati che andranno a costituire una precisa fotografia di un ambiente in un contesto urbano. La raccolta dati è stata resa possibile allo sforzo di diversi colleghi che hanno contribuito alla raccolta settimanale di dati: Marzia Ciampittiello, Diego Fontaneto, Paola Giacomotti, Lyudmila Kamburska, Aldo Marchetto, Simona Musazzi, Arianna Orru, Daniele Paganelli, Tomasa Sbaffi e Silvia Zaupa.

Una prima analisi delle immagini condotta localmente ci ha comunque permesso di identificare alcuni esemplari di macrofauna. Tra i mam-

News

miferi sono stati avvistati tassi, volpi e scoiattoli comuni. Sono stati visti anche diverse specie di uccelli, ma anche insetti e rettili. Conclusa questa prima fase, il progetto si sposterà nel 2022 nel sito di campionamento naturale, dove la strumentazione rimarrà per tutto l'anno prima di tornare nel 2023 a Villa Taranto.

I dati raccolti nell'ambito del progetto LIFEPLAN serviranno non solo per avere un'idea globale della biodiversità ma anche per individuarne le caratteristiche a livello locale. Questo servirà sicuramente per individuare le problematiche attuali e progettare interventi di conservazione e valorizzazione della diversità biologica locale nei prossimi anni.

A cura di:
Angela Boggero; Emanuele Ferrari; Laura Garzoli; Andrea Lami; Stefano Mammola
(Sede di Verbania)

Per maggiori informazioni:

https://www2.helsinki.fi/en/projects/lifeplan

News

Trattamento dei reflui domestici mediante digestione anaerobica: indagine sperimentale e modellizzazione

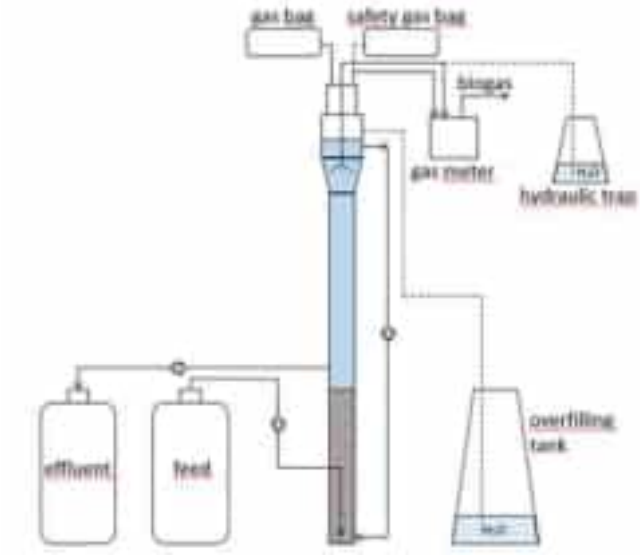
XXXIV ciclo di Dottorato in Processi Chimici per l'Industria e per l'Ambiente

Sapienza Università di Roma

Dott.ssa Valentina Stazi

Durante l'attività di ricerca è stata indagata l'applicazione del processo anaerobico al trattamento delle acque reflue domestiche: tale processo può essere integrato all'interno dei tradizionali impianti a fanghi attivi sia nella linea acque che nella linea di trattamento fanghi. Nel primo caso, un'unità anaerobica è la prima fase del trattamento secondario per ottenere la rimozione biologica del fosforo, mentre nel secondo caso è prevista la digestione/stabilizzazione dei fanghi con produzione di biogas.

Un'alternativa più impegnativa ma vantaggiosa è l'applicazione del processo anaerobico realizzato in bioreattori high-rate, come il reattore UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) per il trattamento diretto delle acque reflue domestiche. Allo stato attuale, mentre le prime risultano essere delle applicazioni consolidate e ampiamente utilizzate, il trattamento anaerobico dei reflui è ancora oggetto di studio per questioni irrisolte che ne ostacolano la diffusione su scala reale, soprattutto nei paesi sviluppati dove i limiti di scarico sono più stringenti e le condizioni climatiche meno favorevoli. E' importante sottolineare che il trattamento anaerobico delle acque reflue domestiche rappresenta una valida alternativa al trattamento aerobico convenzionale a fanghi attivi in quanto, oltre alla depurazione del refluo, consente il recupero sia energetico, attraverso la produzione di biogas, che di nutrienti da poter impiegare nel settore agricolo. Il trattamento anaerobico pertanto, permette una gestione sostenibile delle risorse idriche in quanto i reflui domestici non costituiscono più solo un rifiuto da smaltire, ma una risorsa da cui ricavare vettori energetici e prodotti a valore aggiunto (Stazi and Tomei, 2018). Tale tecnologia è ampiamente diffusa nei Paesi del Sud del mondo (Brasile, Colombia, India) dove le alte temperature favoriscono le cinetiche di biodegradazione, e dove i limiti di emissione allo scarico dettati dalla normativa sono meno restrittivi. Le criticità che attualmente non ne permettono l'applicazione su larga scala anche nei Paesi dal clima non tropicale riguardano prevalentemente le rese del processo. Queste ultime infatti, date le temperature inferiori e il basso carico organico tipico dei reflui domestici, sono minori rispetto ai processi aerobici e sono tali da produrre un refluo in uscita che non rispetta tutti i limiti imposti dalla normativa locale in termini di frazione organica, fosforo, azoto e solidi sospesi (Dolejs et al., 2018; Pfluger et al., 2018). Il progetto di ricerca ha lo scopo dunque di esplorare tali criticità, e di fornire utili soluzioni a supporto di una tecnologia molto promettente.

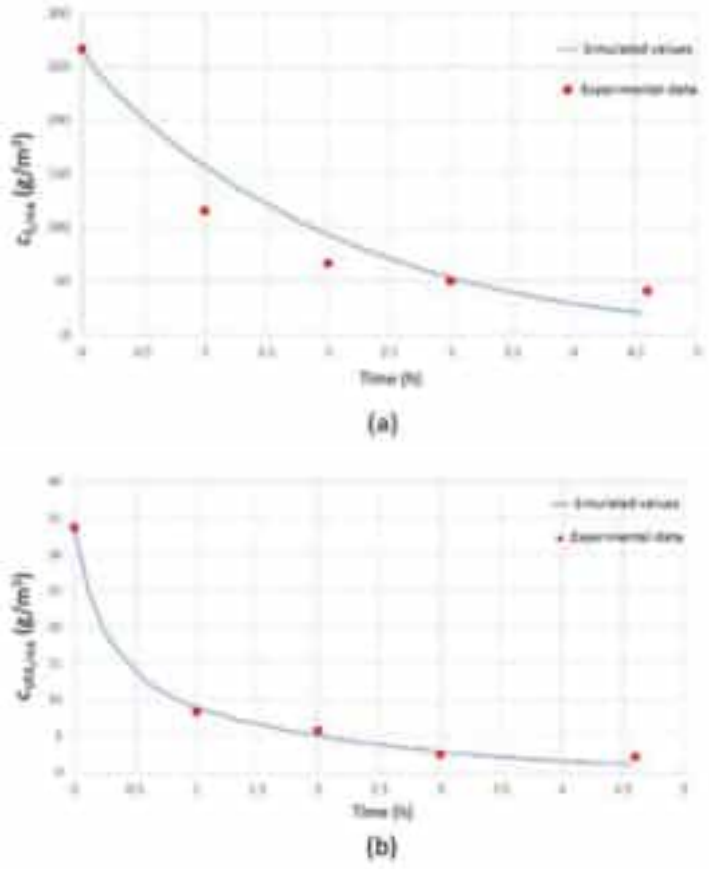


Set-up sperimentale del reattore sequenziale UASB di laboratorio

Il piano sperimentale ha visto l'impiego di un bioreattore UASB, alimentato con un refluo sintetico atto a simulare un tipico scarico domestico, e operante con biomassa granulare a diverse condizioni operative. Il set-up sperimentale è riportato in figura 1. Al variare della temperatura (35, 25 e 15°C) e del tempo di ritenzione idraulica (HRT) (decrescente da 22h a 9h), è stata studiata la risposta del sistema sulle cinetiche di biodegradazione del COD, sulla produzione e composizione del biogas, sulle concentrazioni di solidi totali, nutrienti e metano disciolto nel refluo trattato in uscita dal reattore. I risultati sperimentali hanno rilevato efficienze di rimo-

News

zione del COD fino al 94% e produzioni specifiche di biogas fino a 0.34 m^3/kg $COD_{rimosso}$. In tutte le condizioni operative testate si è ottenuto un effluente di alta qualità in termini di concentrazione di solidi totali, con l'ulteriore vantaggio di essere ricco di azoto e fosforo, e dunque potenzialmente idoneo per l'impiego come fertilizzante agricolo o per il recupero di nutrienti. Per quanto riguarda il COD, invece, si è avuta una diminuzione delle prestazioni solo a 15 °C. A quest'ultima temperatura infatti, è stato possibile abbassare l'HRT fino a 14h in quanto per HRT inferiori il COD in uscita eccedeva i limiti di legge fissati per lo scarico in corpo idrico ricettore.



Relazione tra dati sperimentali e simulati relativi al tasso di degradazione della sostanza organica (a) e dei VFA (b) durante un ciclo di reazione ad HRT di 9h e 25 °C

La produzione specifica di biogas, compresa nell'intervallo 0.11 - 0.34 m^3/kg $COD_{rimosso}$, è in linea con quanto riportato in letteratura per i reflui domestici ma inferiore ai valori teorici previsti per il COD influente a causa dell'intrappolamento di gas nel letto di fango e della sovrasaturazione di metano nella fase liquida (Stazi and Tomei, 2021). Quest'ultimo fenomeno è stato pertanto approfondito tramite misure effettuate sull'effluente trattato del metano disciolto, rivelando perdite di metano a 35 °C e 25 °C rispettivamente di ≈ 24% e ≈ 37% rispetto al totale prodotto, e prevedendo dunque perdite anche maggiori a temperature inferiori a causa dell'aumento della solubilità del metano per temperature decrescenti. Elevate prestazioni, stabilità e la produzione di biogas hanno dimostrato le potenzialità della tecnologia studiata, suggerendo ulteriori indagini per ottimizzare la cinetica di biodegradazione anche in condizioni psicrofile, e massimizzare la produzione di biogas e il recupero di metano disciolto. A tal proposito, un ulteriore contributo del progetto di dottorato è stato quello di analizzare strategie per il recupero del metano disciolto da effluenti anaerobici, con lo scopo non solo di ottimizzare il recupero energetico, ma anche di prevenire il rilascio di un dannoso gas serra nell'atmosfera. Nello specifico sono state proposte e analizzate diverse tecnologie: sia strategie per il recupero del metano come fonte di energia attraverso metodi fisici (aerazione, strippaggio del gas, membrane di degasaggio), sia il riutilizzo del metano all'interno dello stesso schema di trattamento tramite ossidazione biologica. Tra le più promettenti strategie di rimozione biologica risulta di particolare interesse il recente processo basato sulla denitrificazione e sull'ossidazione anaerobica del metano (processo DAMO) (Sánchez et al., 2016).

Parallelamente all'attività di laboratorio è stato sviluppato un modello matematico impiegando il software *COMSOL Multiphysics*. Il modello, inizialmente realizzato con lo scopo di descrivere un singolo granulo di biomassa, è stato successivamente implementato alla scala del reattore con l'obiettivo di fornire un valido strumento per la progettazione e la simulazione dina-

News

mica dei reattori UASB. La formulazione del modello è avvenuta semplificando il reale processo di digestione anaerobica, il quale coinvolge diverse specie batteriche, substrati e prodotti di reazione, considerando tre substrati (sostanza organica, VFA e biogas) e tre popolazioni batteriche (acidogeni, metanigeni e biomassa inerte derivante dal decadimento endogeno delle due precedenti). Il modello granulo ha permesso di simulare la distribuzione dei substrati e delle biomasse all'interno di un granulo di forma sferica, mentre il modello reattore ha consentito di valutare i parametri cinetici che maggiormente influenzano il processo anaerobico, ovvero la massima velocità specifica di crescita degli acidogeni ($\mu_{m,1}$) e dei metanigeni ($\mu_{m,2}$). Il modello proposto ha mostrato un buon *fitting* tra i dati sperimentali e i valori calcolati dal modello in merito alla degradazione della materia organica e dei VFA per un ciclo di reazione e alle diverse condizioni operative. A titolo di esempio, in figura 2 è mostrata la corrispondenza tra valori sperimentali e simulati riferiti alla degradazione della sostanza organica e dei VFA durante un ciclo di reazione ad HRT pari a 9h e alla temperatura di 25°C.

I promettenti risultati riportati nella tesi di dottorato hanno dimostrato le potenzialità del processo di digestione anaerobica applicato al trattamento dei reflui domestici, fornendo inoltre spunti di riflessione e di ricerca al fine di diffondere una tecnologia sostenibile in linea con i principi dell'economia circolare.

BIBLIOGRAFIA

Dolejs, P., El Tayar, G., Vejmelkova, D., Pecenka, M., Polaskova, M., and Bartacek, J. (2018). Psychrophilic anaerobic treatment of sewage: biomethane potential, kinetics and importance of inoculum selection. J. Clean. Prod. 199, 93–100.

Pfluger, A., Vanzin, G., Munakata-Marr, J., and Figueroa, L. (2018). An anaerobic hybrid bioreactor for biologically enhanced primary treatment of domestic wastewater under low temperatures. Environ. Sci. Water Res. Technol. 4 (11), 1851–1866.

Sánchez, A., Rodríguez-Hernández, L., Buntner, D., Esteban-García, A.L., Tejero, I., and Garrido, J.M. (2016). Denitrification coupled with methane oxidation in a membrane bioreactor after methanogenic pre-treatment of wastewater. J. Chem. Technol. Biotechnol. 91(12), 2950-2958.

Stazi, V., and Tomei, M.C. (2018). Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative technologies and future perspectives. Sci. Total Environ. 635, 78-91.

Stazi, V., and Tomei, M.C. (2021). Dissolved methane in anaerobic effluents: A review on sustainable strategies for optimization of energy recovery or internal process reuse. J. Clean. Prod., 128359.

News

Natural microbial communities and their role in organic contaminant removal

Doctor Europaeus in Ecologia e gestione sostenibile delle risorse ambientali

Università degli Studi della Tuscia - A.A. 2019-2020

Dott.ssa Ludovica Rolando

L'intensa industrializzazione e le diverse attività antropiche causano il rilascio continuo di contaminanti nell'ambiente con effetti dannosi sugli ecosistemi acquatici e del suolo.

I contaminanti organici includono un numero molto elevato di sostanze di origine sia naturale che xenobiotica e quelli che persistono e/o bioaccumulano possono manifestare elevata tossicità per il biota. Di conseguenza, studi e soluzioni per il recupero ambientale da sostanze chimiche sono una priorità e sfida della ricerca attuale. In questo contesto, i microrganismi svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della stabilità ambientale (resistenza e resilienza), fornendo servizi ecosistemici di regolazione che garantiscono la qualità del suolo e dell'acqua.

Lo scopo generale di questa tesi è stato quello di valutare il ruolo delle comunità microbiche naturali nella rimozione di due classi di contaminanti organici diffusi quali i tensioattivi anionici e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

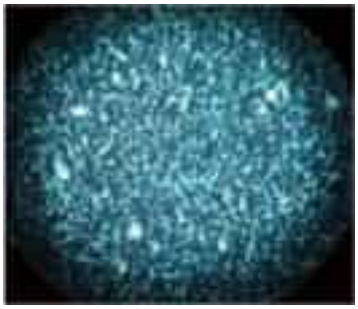


Immagine al microscopio ad epifluorescenza del consorzio batterico identificato

In una prima ricerca sperimentale, è stato identificato, sequenziato e caratterizzato da un punto di vista funzionale, un consorzio batterico da un terreno proveniente dallo scavo di una galleria ferroviaria (Figura 1). Il terreno conteneva residui di sodio lauril etere solfato (SLES) derivanti dagli agenti schiumogeni necessari per il funzionamento della fresa meccanica utilizzata per lo scavo.

Il consorzio (caratterizzato principalmente dal genere *Pseudomonas*) è in grado di utilizzare il tensioattivo SLES come unica fonte di carbonio e degradarlo in poche ore (Rolando et al., 2020a). Il successivo esperimento di *bioaugmentation* (Figura 2) nello stesso terreno scavato ha mostrato l'efficacia del consorzio batterico nel ridurre i tempi di stoccaggio e consentire un rapido riutilizzo del terreno come sottoprodotto (Rolando et al., 2021). Questa tecnologia che rientra nelle cosiddette "*nature-based solutions*" risponde agli obiettivi dell'economia circolare, consentendo di evitare una produzione di inutile di rifiuti e risparmiare i costi di smaltimento e dell'occupazione di suolo nelle discariche.

Graphical abstract sull'utilizzo del consorzio batterico identificato in esperimenti di *bioaugmentation*

Nella seconda ricerca sperimentale, svolta nell'ambito di un periodo all'estero (6 mesi) presso il Laboratorio di Biorimedio e Biodisponibilità dell'Istituto di Risorse Naturali e Agrobiologia (IRNAS-CSIC, Siviglia, Spagna, coordinato dal Dott. Jose Julio Ortega-Calvo), è stato studiato il comportamento chemiotattico verso l'idrocarburo pirene.

Attraverso esperimenti in colonna e in batch è stato dimostrato il ruolo potenziale di *Pseudomonas putida* G7 (Figura 3) nel cometabolismo e nel bioassorbimento del pirene. *Pseudomonas putida* G7 è un batterio mobile in grado di rispondere chemiotatticamente al salicilato (un intermedio metabolico della biodegradazione

News

degli IPA) mostrando movimento rettilineo e tassi positiva.

Il ceppo mobile G7 è stato in grado, attraverso il bioassorbimento, di mobilitare il pirene e trasformarlo per cometabolismo (Figura 4), (Rolando et al., 2020b). Questo lavoro mostra come alcuni batteri dotati di mobilità possano essere attivamente mobilitati verso la fonte di contaminazione e promuovere la biodisponibilità di molecole poco accessibili, favorendo la loro trasformazione come nel caso degli IPA. Questa ricerca è il punto di partenza per lo sviluppo di strategie di biorimedio innovative di contaminanti scarsamente biodisponibili nei suoli.

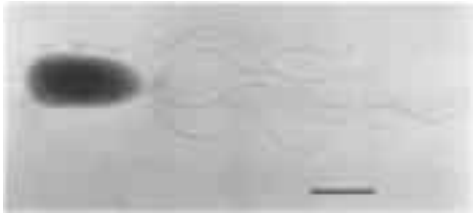


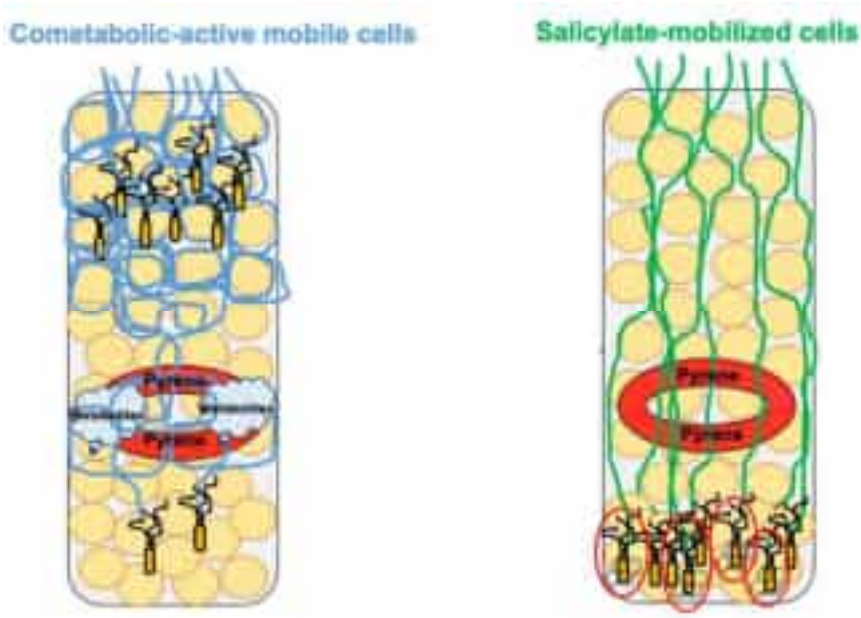
Immagine del batterio mobile *Pseudomonas putida* G7

Tutor: Dott.ssa Anna Barra Caracciolo, IRSA-CNR

Co-tutor: Dott. Jose Julio Ortega-Calvo, Institute of Natural Resources and Agrobiology of Seville, Spanish National Research Council (CSIC).

PUBBLICAZIONE DEI RISULTATI

Rolando, L., Barra Caracciolo, A., Grenni, P., Mariani, L., Rauseo, J., Spataro, F., et al. (2021). Bioaugmentation With a Consortium of Bacterial Sodium Lauryl Ether Sulfate-Degraders for Remediation of Contaminated Soils. Front. Microbiol. 12, 2555. doi:10.3389/fmicb.2021.740118.



Graphical abstract degli esperimenti di trasporto in colonna in assenza e presenza di salicilato.

Rolando, L., Grenni, P., Rauseo, J., Pescatore, T., Patrolecco, L., Garbini, G. L., et al. (2020a). Isolation and Characterization in a Soil Conditioned With Foaming Agents of a Bacterial Consortium Able to Degrade Sodium Lauryl Ether Sulfate. Front. Microbiol. 11, 1542. doi:10.3389/fmicb.2020.01542.

Rolando, L., Vila, J., Baquero, R. P., Castilla-Alcantara, J. C., Barra Caracciolo, A., and Ortega-Calvo, J.-J. (2020b). Impact of bacterial motility on biosorption and cometabolism of pyrene in a porous medium. Sci. Total Environ. 717, 137210. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137210.

.

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)
e-mail: redazione.notiziario@irsa.cnr.it

Direttore responsabile
Giuseppe Mascolo

Direttore Scientifico
Stefano Polesello

Comitato di Redazione
L. Campanella, A.M. De Girolamo, P. Grenni, L. Guzzella, S. Polesello, L. Patrolecco, S. Valsecchi

Segreteria di Redazione
S. Ghergo

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