



In questo numero:

Determinazione in continuo del mercurio gassoso disciolto (DGM) nelle acque con dispositivo di misura portatile **2**

Determinazione di fragranze sintetiche in acque di scarico e fanghi di depurazione **8**

Valutazione della qualità dei sedimenti marini e salmastri con il Crostaceo Anfipode *Gammarus aequicauda* **16**

News:

Progetto LIFE PHOENIX per la gestione dell'inquinamento idrico da PFAS in Veneto: Risultati preliminari dopo due anni di progetto **22**

Il Progetto SIMILE: Tecnologia e innovazione per il monitoraggio dei laghi **25**

Campagna di Citizen Science - SOS Pinna: la Subacquea aiuta la Ricerca **27**

Editoriale

*Questo numero del 2019 del Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News include contributi di ricercatori delle due nuove sedi dell'IRSA, Taranto e Verbania, che a settembre 2018 sono state inserite nella nuova struttura dell'Istituto. È anche doveroso ringraziare la precedente direzione IRSA per aver continuato ad alimentare l'iniziativa del Notiziario. I colleghi delle sedi di Taranto e Verbania hanno subito apprezzato il Notiziario e sono presenti in questo numero con due contributi, il primo relativo alla determinazione in continuo del mercurio gassoso disciolto nelle acque con un dispositivo di misura portatile che risulta utile per le analisi di flussi di mercurio, il secondo riguarda la valutazione della qualità dei sedimenti marini e salmastri con il Crostaceo Anfipode *Gammarus aequicauda* che amplia l'utilizzo di organismi marini per test ecotossicologici. Il terzo contributo riguarda la determinazione di fragranze sintetiche in acque di scarico e fanghi di depurazione. Tali composti organici, derivanti dal largo utilizzo di prodotti per l'igiene personale e la pulizia domestica, sono solo parzialmente rimossi dagli impianti di depurazione convenzionali ai quali giungono attraverso la rete fognaria. Di conseguenza, le ingenti quantità utilizzate di queste sostanze rendono essenziale un approfondimento in termini di presenza nell'ambiente. La tecnica analitica proposta è la microestrazione in fase solida accoppiata a gas cromatografia con rivelatore di massa.*

*Nella seconda sezione (News) trovano spazio: la presentazione del progetto LIFE PHOENIX (Perfluorinated compounds HOlistic ENvironmental Interinstitutional eX-perience) finalizzato alla gestione dell'inquinamento idrico da PFAS in Veneto, con una breve sintesi dei risultati ottenuti dopo due anni di attività; la presentazione del progetto SIMILE (Sistema Informativo per il Monitoraggio Integrato dei Laghi insubrici e dei loro Ecosistemi), finanziato nell'ambito del Programma di Cooperazione INTERREG Italia-Svizzera 2014-2020, che ha l'obiettivo di rafforzare la gestione coordinata delle acque dei laghi dell'area insubrica e di accrescere la partecipazione degli stakeholder ai processi di conoscenza e di gestione della risorsa idrica; la presentazione della campagna di Citizen Science "SOS Pinna: la Subacquea aiuta la Ricerca" con la quale, durante l'estate 2018, il gruppo subacqueo della Sede di Taranto dell'IRSA ha condotto un'attenta valutazione della moria di *Pinna nobilis* L., un mollusco bivalve filtratore, endemico del Mediterraneo che può raggiungere oltre 1 metro di lunghezza e vivere fino a più di 30 anni, che è avvenuta nel Mar Piccolo e nel Mar Grande dove era presente una popolazione di oltre 10.000 individui.*

Giuseppe Mascolo
Direttore del Notiziario

Determinazione in continuo del mercurio gassoso disciolto (DGM) nelle acque con dispositivo di misura portatile

a cura di

Laura Fantozzi (*), Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Verbania

Romano Ferrara, Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Biofisica - Pisa

RIASSUNTO

È stato sviluppato un metodo per l'analisi in continuo della concentrazione di mercurio gassoso disciolto (DGM) in acque naturali. Il metodo è stato messo a punto realizzando un dispositivo automatico controllato da un computer portatile, dotato di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico con limite di rilevabilità di 0,5 pg. La risoluzione temporale del dispositivo di misura è di 10-15 minuti. Una caratteristica particolare di questo dispositivo di misura è la portabilità, che ne rende adatto l'uso in luoghi remoti mediante una batteria per auto. Sono stati confrontati i risultati ottenuti usando il dispositivo in modalità continua e in modalità discreta. Dal confronto emerge un buon accordo, considerando che i campioni di acqua sono stati campionati con uno sfasamento temporale. Per confrontare campioni raccolti contemporaneamente, è stato utilizzato un secondo dispositivo analitico, funzionante in modalità discreta. I risultati delle misure eseguite con la modalità discreta sono leggermente superiori a quelli delle misure eseguite in modalità continua. Evitando la manipolazione del campione, è stato possibile ridurre la contaminazione da fonti esterne e raggiungere bassi valori di bianco strumentale (1-2 pg). Le prestazioni sul campo di questo metodo sono state testate in acqua di mare e in acqua di laguna. In quest'ultimo caso, è stato determinato l'andamento giornaliero del DGM. In accordo con diversi autori, è stato notato uno sfasamento temporale tra DGM e intensità della radiazione solare superiore alla risoluzione temporale strumentale.

SUMMARY

An analytical method for continuous analysis of dissolved gaseous mercury (DGM) concentration in natural waters, is described. The method has been developed with the implementation of a fully automatic device controlled by a Notebook, equipped with an Atomic Absorption Spectrometer with a detection limit of 0.5 pg. Time resolution of the device is 10-15 min. A particular feature of this instrument is the portability, making its use suitable in remote locations by means of a car battery. Results obtained using the device in the continuous mode and in the discrete mode have been compared. They show good agreement taking into consideration that water samples were collected with shifting sampling times. To compare samples collected at the same time, a second analytical device, running in the discrete mode, was used. In this case results show that measurements performed with the discrete mode are slightly higher than the continuous one. Avoiding the sample handling it was possible to reduce the contamination from external sources and to achieve low instrumental blank values (1-2 pg). The field performance of this portable instrument was tested on seawater and lagoon water, where the DGM daily behavior was measured. In agreement with several authors, a time shifting between DGM and solar radiation intensity higher than the instrumental resolution time was noted.

1. INTRODUZIONE

Il flusso di mercurio fra le superficie acquatiche e l'atmosfera è un processo significativo all'interno del ciclo biogeochimico del mercurio e costituisce una delle fonti di mercurio più importanti per l'atmosfera (Gårdfeldt et al., 2001; Gustin et al., 2000; Mason and Fitzgerald, 1996). Lo scambio di mercurio all'interfaccia aria-acqua è il risultato della formazione di forme gassose disciolte di mercurio (DGM) nelle acque naturali, che passano dalla colonna d'acqua all'atmosfera. In questo modo il mercurio viene rimosso dalla colonna d'acqua e non è più disponibile per i processi di metilazione e bioaccumulo lungo la catena trofica. La formazione di DGM sembra essere gui-

data principalmente dall'intensità della radiazione solare (Amyot et al., 1997; Kotnik et al., 2004; Lanzilotta et al., 2002; Tessier et al., 2003). Il flusso di mercurio può essere stimato utilizzando modelli predittivi (Wanninkhof and McGillis, 1999), basati sulla conoscenza delle concentrazioni di DGM, di mercurio gassoso elementare in aria (GEM), e di parametri chimico-fisici che regolano la diffusività molecolare del mercurio. Nonostante la sua importanza nel ciclo globale del mercurio, la concentrazione di DGM nelle acque naturali è dell'ordine di pochi picogrammi per litro e mostra variazioni significative e rapide durante il ciclo diurno. Nelle acque lacustri sono state osservate variazioni fino al 50% della concentrazione di DGM in un intervallo temporale di 20 minuti (Siciliano et al., 2002). Una determinazione accurata della con-

* laura.fantozzi@irsa.cnr.it

concentrazione di DGM richiede un dispositivo strumentale in grado di effettuare analisi continue in modalità automatica con una risoluzione temporale breve, che eviti la conservazione e la manipolazione dei campioni di acqua. Il metodo qui descritto fa uso di un dispositivo completamente automatico controllato da un computer portatile e viene descritto insieme ad alcuni risultati preliminari sull'andamento giornaliero della concentrazione di DGM nelle acque marine e lagunari. La novità di questa strumentazione è la sua portabilità: questa funzione ne consente l'uso in luoghi remoti utilizzando una batteria per auto come alimentatore e l'aria ambiente come gas di trasporto. Questo dispositivo è stato sviluppato nell'ambito del progetto europeo MERCYMS (un approccio integrato per valutare il ciclo del mercurio nel bacino del Mediterraneo), dedicato allo studio dei meccanismi di formazione di DGM nelle acque naturali e alla sua relazione con i flussi di mercurio tra le superfici acquatiche e l'atmosfera.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa sulla misura in continuo di mercurio mediante spettrofotometria di assorbimento atomico. Nella figura 1 è riportato lo schema del dispositivo per l'analisi continua della concentrazione di DGM. Si tratta di una nuova strumentazione completamente automatica, controllata da un computer portatile, con un limite di rivelabilità di 0,5 pg e una risoluzione temporale di 10-15 minuti, che permette di ottenere misure molto accurate della concentrazione di DGM nelle acque.

Le piccole quantità di mercurio che devono essere misurate, dell'ordine dei picogrammi, impongono di evitare qualsiasi tipo di trattamento del campione, al fine di raggiungere bassi livelli accettabili di bianco strumentale (1-2 pg).

Il dispositivo è costituito da due moduli: il primo è deputato al campionamento continuo dell'acqua (tramite due pompe peristaltiche), all'estrazione del DGM e alla sua concentrazione su una trappola in oro. L'automatismo del dispositivo è ottenuto grazie all'utilizzo di valvole di sicurezza a manicotto (singole e doppie). Queste valvole controllano il flusso dell'acqua nel sistema di tubi evitando il contatto dei fluidi. Il secondo modulo è dedicato alla determinazione del DGM tramite uno spettrofotometro ad assorbimento atomico (analizzatore di vapori di mercurio GARDIS), controllato da un computer portatile e contenente la trappola analitica in oro.

Il mercurio desorbito termicamente dalla trappola analitica viene determinato all'interno della cella di assorbimento dello spettrofotometro (cella di misura, costituita da un tubo di quarzo della lunghezza di 20 cm, del diametro interno di 3 mm). Uno specchio fa in modo che il raggio luminoso emesso da una lampada UV a vapori di mercurio nella lunghezza d'onda di 253,7 nm raggiunga la cella d'assorbimento. Se qui sono presenti atomi di mercurio elementare, essi assorbono parte del raggio, che in tal modo presenta una diminuzione dell'intensità proporzionale alla quantità di atomi di mercurio elementare presenti nella cella. Lo spettrofotometro utilizzato è detto a

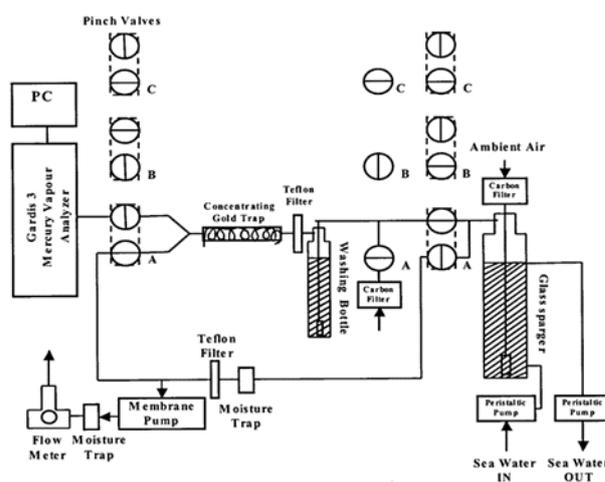


Figura 1. Schema del dispositivo automatico per misurazioni continue della concentrazione di DGM.

doppio raggio: il raggio luminoso proveniente dalla lampada UV viene alternativamente fatto passare attraverso la cella di misura e attraverso una seconda cella di riferimento, identica alla prima e posta accanto ad essa. Un fotorivelatore misura la differenza di intensità luminosa che esce dalle due celle. In tal modo viene ridotto l'errore nella determinazione della quantità di mercurio dovuto a riflessioni interne alla cella di misura e ad eventuali variazioni dell'emissione della lampada UV.

Rispetto alla versione originale, lo spettrofotometro è stato modificato portando all'esterno la trappola in oro di concentrazione: questo ha permesso un riscaldamento della stessa a 50°C per ridurre problemi di condensa, e di evitare che l'aria passi sempre all'interno della cella d'assorbimento durante il tempo di campionamento, determinandone una possibile contaminazione (Ferrara and Mazzolai, 1998). Le modifiche introdotte e la doppia amalgamazione su oro hanno consentito di raggiungere un limite di rivelabilità di 0,5 pg di mercurio.

Per il controllo del flusso di gorgogliamento, è stato impiegato un flussimetro a galleggiante dotato di rubinetto a spillo per la regolazione (ASA modello 1900).

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura analitica è applicabile a tutte le acque naturali. La procedura ha un'elevata riproducibilità (2% con un numero di replicati pari a 7).

4. CAMPIONAMENTO

Negli esperimenti preliminari l'acqua è stata campionata a una profondità di 10-20 cm usando un tubo di teflon di 4 mm di diametro interno, collegato alla pompa peristaltica dedicata al prelievo del campione. Considerando che la lunghezza del tubo di teflon per il prelievo dell'acqua era 10 e che la portata era di 50 mL min⁻¹, si stima che il ritardo per il trasporto del campione sia di circa 2,5 minuti.

Tramite la pompa peristaltica l'acqua viene raccolta in una bottiglia di vetro Pyrex cilindrica del volume di 1000 mL e del diametro interno di 6 cm, fornita di un

gorgogliatore anch'esso di vetro, finché raggiunge il volume di 500 mL. Una seconda pompa peristaltica mantiene fisso il livello di acqua all'interno della bottiglia, eliminando l'eccesso.

Lo stesso dispositivo può essere utilizzato anche in modalità discreta, mantenendo spente le pompe peristaltiche durante il tempo di estrazione del DGM, quando è accesa la pompa a membrana esterna. In questo caso i campioni di acqua di mare superficiali sono stati prelevati a pochi metri dalla costa nelle stesse stazioni del campionamento effettuato in continuo. Per il campionamento è stata utilizzata una bottiglia di vetro Pyrex cilindrica del volume di 1000 mL e del diametro interno di 6 cm attaccata ad un'asta di PVC.

5. INTERFERENZE

Per evitare problemi di contaminazione si raccomanda che le componenti utilizzate per il campionamento consistano di vetreria in Pyrex e di tubi di Teflon mantenuti in una soluzione diluita di acido nitrico per diminuire la quantità di mercurio presente sulle pareti altrimenti rilasciato nel campione, e lavati più volte con acqua distillata.

La bottiglia dove avviene il gorgogliamento, la bottiglia di lavaggio e i tubi di Teflon devono essere isolati termicamente per impedire variazioni di temperatura e devono essere mantenuti in condizioni di assenza di luce, dal momento che alla luce i composti volatili del mercurio si possono formare a partire dal mercurio divalente presente nel campione stesso.

6. APPARECCHIATURE

- 6.1 Spettrofotometro ad assorbimento atomico GARDIS (Lituania);
- 6.2 Elettrovalvola a manicotto singola SIRAI 12 V, S10408 M4 (Italia);
- 6.3 Elettrovalvola a manicotto doppia SIRAI 12 V, S30506 A4 (Italia);
- 6.4 Pompa a membrana KNF 12 V, NMP 30 KNDC (Germania);
- 6.5 Pompa peristaltica MASTERFLEX P-07533-60 (USA);
- 6.6 Filtro a carbone WHATMAN 6704-1500 (USA);
- 6.7 Filtro di Teflon SARTORIUS SRP 25 0.45 mm (Germania);
- 6.8 Flussimetro SIERRA INSTRUMENTS (USA).

7. METODO

7.1 Determinazione del DGM

La determinazione del DGM avviene in 3 fasi:

1. Estrazione del DGM
2. Misura del DGM
3. Fase di intervallo fra due cicli di misura

Nella prima fase (Fig. 1, valvole di sicurezza in posizione A) l'aria esterna resa priva di mercurio tramite un filtro a carbone, viene aspirata da una pompa a membrana e passa attraverso il gorgogliatore di ve-

tro. Il DGM estratto è trasportato e amalgamato su una trappola in oro, detta "di concentrazione". Questa è costituita da un tubetto in quarzo (lunghezza 12,0 cm, diametro interno 0,4 cm) contenente 1,0 g di lana di oro, tenuta in posizione da lana di quarzo. Una bottiglia di vetro Pyrex di lavaggio, contenente 10 mL di acqua distillata, purifica l'aria aspirata dal sale dell'acqua di mare che si forma durante il gorgogliamento. Un filtro di Teflon (Sartorius, Minisart 17576, porosità 0,45 μm), inserito fra la bottiglia di lavaggio e la trappola in oro, trattiene il materiale particellato. La trappola in oro è mantenuta ad una temperatura di circa 50 °C da una resistenza in nichel-cromo avvolta attorno alla trappola in oro, per evitare problemi legati alla condensa del vapore acqueo ed alla conseguente diminuzione di efficienza di cattura del mercurio. Il flusso di aria esterna (700 mL min⁻¹) è controllato da un flussimetro protetto dall'umidità attraverso una trappola di vetro.

Nella seconda fase (Fig. 1, valvole di sicurezza in posizione B) la trappola in oro "di concentrazione" è riscaldata fino ad una temperatura di circa 350 °C, in modo che il mercurio raccolto sulla trappola in oro viene desorbito termicamente e trasportato all'analizzatore di vapori di mercurio (GARDIS).

Attraverso l'apertura di una valvola a manicotto, i vapori di mercurio passano all'interno dell'analizzatore e sono raccolti su una seconda trappola in oro detta "analitica", grazie ad una pompa interna all'analizzatore stesso e all'apertura della valvola di sicurezza. Durante questa fase la pompa a membrana esterna mantiene fisso il flusso di aria all'interno della bottiglia dove avviene il gorgogliamento.

Nella terza fase (Fig. 1, valvole di sicurezza in posizione C) la pompa a membrana esterna mantiene fisso il flusso di aria all'interno della bottiglia dove avviene il gorgogliamento, fino all'inizio di un nuovo ciclo di misura.

La determinazione della concentrazione di mercurio elementare viene effettuata usando una versione modificata dell'analizzatore di vapori di mercurio GARDIS, con un limite di rivelabilità di 0,5 pg di mercurio. Questo strumento è uno spettrofotometro ad assorbimento atomico basato sulla tecnica della doppia concentrazione su oro; la modifica consiste nell'aggiunta della trappola "di concentrazione" all'esterno dello spettrofotometro.

Durante il tempo di misura l'aria proveniente dal gorgogliamento del campione, attraversata la trappola in oro "di concentrazione", viene re-immessa all'esterno, senza entrare all'interno dello spettrofotometro. In tal modo vapore acqueo e sali presenti nell'aria non attraversano la cella di assorbimento interna dello spettrofotometro.

Un programma specifico in un computer portatile permette di fissare il tempo di estrazione del DGM (in genere 5-10 min), l'intervallo fra due misure consecutive e costruisce il grafico dell'andamento del DGM in funzione del tempo.

Lo stesso sistema utilizzato per la misura della concentrazione di DGM in continuo può essere usato in modalità discreta per misurare la concentrazione di DGM in 500 mL di acqua. Le pompe peristaltiche so-

no spente durante il tempo di estrazione, quando è accesa la pompa a membrana esterna. In questo caso, il valore del bianco dell'intero sistema di misura è risultato essere 2-4 pg di mercurio.

7.2 Taratura dello spettrofotometro ad assorbimento atomico GARDIS

La curva di taratura dello spettrofotometro è stata effettuata iniettando sull'oro della trappola di concentrazione quantità note e crescenti di mercurio (da 0 a 50 pg), utilizzando microsiringhe a tenuta di gas (Hamilton) da 25 e 50 µl. Le quantità note di mercurio sono state prelevate da un generatore di vapori di mercurio, costituito da un contenitore mantenuto a 4°C e contenente delle gocce di mercurio. Il mercurio allo stato liquido passa in forma di vapore nell'aria all'interno del generatore, finché quest'ultima non viene saturata. La pressione all'interno del generatore è mantenuta uguale a quella ambiente. La concentrazione di mercurio all'interno del generatore è funzione della sua temperatura.

7.3 Applicazione pratica del metodo: risultati

Nella figura 2 sono rappresentati due esempi dell'andamento giornaliero della concentrazione di DGM ottenuti rispettivamente nel mar Mediterraneo presso la stazione oceanografica "Stareso" (Isola di Corsica) il 21 Luglio 2004 e nella laguna di Orbetello (GR) il 30 Settembre 2004. Contemporaneamente è stata misurata l'intensità della radiazione solare nelle regioni PAR, UVA e UVB dello spettro elettromagnetico. Nei grafici è stato riportato solo l'andamento dell'intensità della radiazione PAR; le componenti UVA e UVB mostrano un andamento simile a quello della PAR ma presentano valori di intensità minori (rispettivamente 6-10 e 300-400 volte inferiori a quelli della PAR). La figura 2 mette in evidenza l'importanza di misurare la concentrazione di DGM con una bassa risoluzione

temporale e sottolineano la relazione che esiste fra l'andamento della concentrazione di DGM e l'andamento dell'intensità della radiazione solare; risulta chiaro che la concentrazione di DGM mostra un andamento molto simile a quello dell'intensità della radiazione solare. In accordo con vari autori (Amyot et al., 1994; Amyot et al., 1997; O'Driscoll et al., 2003), è stato notato uno sfasamento temporale tra i due andamenti più elevato della risoluzione temporale strumentale.

Per fare un confronto tra le due modalità di misura (continua e discreta) nelle stesse condizioni meteorologiche, sono state confrontate le concentrazioni DGM misurate presso la stazione oceanografica Stareso (Isola di Corsica) con due diverse strumentazioni utilizzate contemporaneamente: il dispositivo descritto nell'articolo utilizzato in modalità continua e un dispositivo analogo ma privo di pompe peristaltiche e basato sulla determinazione del mercurio elementare tramite spettrofotometria a fluorescenza (Tekran 2500), utilizzato in modalità discreta. Come si può vedere nelle tabelle 1 e 2 i valori di concentrazione di DGM ottenuti con la modalità discreta sono leggermente più elevati rispetto a quelli misurati usando il dispositivo automatico. Questa differenza è imputabile ai valori più alti del bianco nella modalità discreta, ma anche al fatto che i dispositivi di misura sono leggermente diversi. È stato provato anche che una risoluzione temporale inferiore (5 min) può essere raggiunto utilizzando una bottiglia di misura da 500 mL e un campione di acqua di 250 mL.

CONCLUSIONI

Il dispositivo automatico per l'analisi continua di DGM consente di ottenere una bassa risoluzione temporale, un requisito importante per comprendere la correlazione del DGM con altri parametri ambientali e per ridurre al minimo i problemi relativi alle sue variazioni temporali. Un altro vantaggio consiste nel ridurre la

Fig. 2a

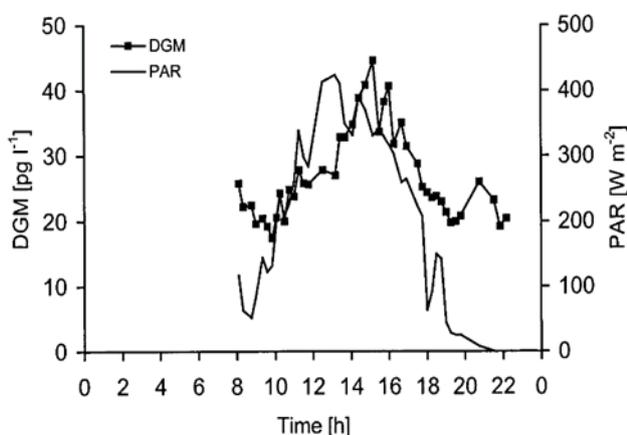


Fig. 2b

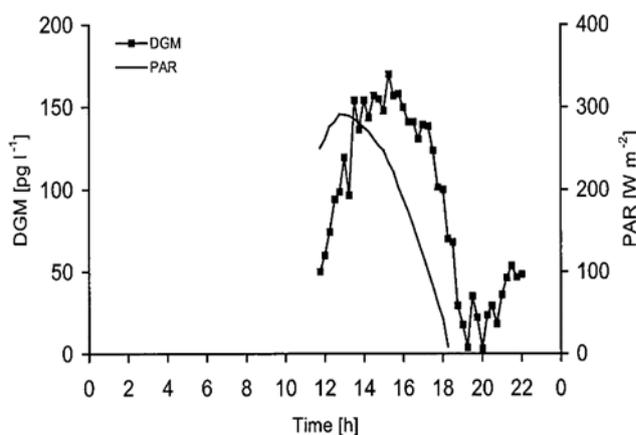


Figura 2.

a. Andamento giornaliero della concentrazione di DGM e intensità della radiazione solare nella regione PAR (Radiazione Fotosinteticamente Attiva) dello spettro elettromagnetico, ottenuto presso la stazione oceanografica "Stareso" (Isola di Corsica) (21 Luglio 2004).

b. Andamento giornaliero della concentrazione di DGM e intensità della radiazione solare nella regione PAR (Radiazione Fotosinteticamente Attiva) dello spettro elettromagnetico, ottenuto nella laguna di Orbetello (GR) (30 Settembre 2004).

Tabella 1. Confronto dei valori di concentrazione di DGM misurati in modalità continua con quelli misurati in modalità discreta; valori di intensità della radiazione solare misurati nella regione PAR (radiazione fotosinteticamente attiva) dello spettro elettromagnetico (400-700 nm). n = numero di repliche.

	Modalità continua				Modalità discreta			
	DGM (pg L ⁻¹)	n	Ora (h)	PAR (W m ⁻²)	DGM (pg L ⁻¹)	n	Ora (h)	PAR (W m ⁻²)
Mar Mediterraneo-offshore (27 Ottobre 2004)	25.6-27.0	2	15:00-15:30	111-123	27.4-33.4	2	15:45-16:05	98-105
Stazione oceanografica Stareso-Corsica (16 Giugno 2004)	111.8	1	11:30	350	121.5	1	11:30	350
	123.6	1	12:00	370	135.4	1	12:00	370
	109.0	1	12:30	373	120.3	1	12:30	373
	76.8	1	15:00	369	79.6	1	15:00	369
	61.6	1	15:30	348	79.0	1	15:30	348
	76.0	1	16:00	105	101.4	1	16:00	105
	25.4	1	21:00	2	26.2	1	21:00	2
	20.8	1	21:30	0	22.2	1	21:30	0
	18.0	1	22:00	0	19.8	1	22:00	0

Tabella 2. Valori medi e deviazione standard della concentrazione di DGM misurata in modalità continua e in modalità discreta presso la Stazione oceanografica Stareso in Corsica (16 giugno 2004).

Ora (h)	Modalità continua		Modalità discreta	
	Valore medio di DGM (pg L ⁻¹)	SD	Valore medio di DGM (pg L ⁻¹)	n
11:30-12:30	114.8	±7.7	125.7	±8.4
15:00-16:00	71.5	±8.5	86.6	±12.8
21:00-22:00	21.4	±3.7	22.7	±3.2

contaminazione da fonti esterne durante il campionamento. Inoltre, evitando la manipolazione del campione, è possibile ottenere valori di bianco strumentale molto bassi. Il dispositivo descritto è portatile per l'uso in luoghi remoti con una batteria per auto. Inoltre, va notato che non è necessario utilizzare gas di trasporto speciale poiché lo spettrometro ad assorbimento atomico GARDIS funziona con aria ambiente priva di mercurio.

BIBLIOGRAFIA

- AMYOT M., MIERLE G., LEAN D.R.S., MCQUEEN D. (1994): "Sunlight-induced formation of dissolved gaseous mercury in lake waters", *Environ. Sci. Technol.*, 28, 2366-2371.
- AMYOT M., MIERLE G., LEAN D.R.S., MCQUEEN D. (1997): "Effect of solar radiation on the formation of dissolved gaseous mercury in temperate lakes", *Geochem. Cosmochem. Acta*, 61, 975-987.
- FERRARA R., MAZZOLAI B. (1998): "A dynamic flux chamber to measure mercury emission from aquatic system", *Sci. Total Environ.*, 215, 51-57.
- GÅRDFELDT K., FENG X., SOMMAR J., LINDQVIST O. (2001): "Total gaseous mercury exchange between air and water over lake and sea surfaces", *Atmos. Environ.*, 35, 3027-3038.
- GUSTIN M.S., LINDBERG S.E., AUSTIN K., COOLBAUGH M., VETTE A., ZHANG H. (2000): "Assessing the contri-

bution of natural sources to regional atmospheric mercury budgets”, *Sci. Total Environ.*, 259, 61-71.

KOTNIK J., HORVAT M., FAJON V., OGRINC N., LOGAR M., GIBICAR D. (2004): “Mercury speciation in surface and deep-sea waters of the Mediterranean Sea”, *RMZ -Mat. Geoenviron.*, 51, 1147-1149.

LANZILLOTTA E., CECCARINI C., FERRARA R. (2002): “Photo-induced formation of dissolved gaseous mercury in coastal and offshore seawater of the Mediterranean basin”, *Sci. Tot. Environ.*, 300, 179-187 (2002).

MASON R.P., FITZGERALD W.F. (1996): “Sources, sinks and biogeochemical cycling of mercury in the ocean”. In: “Global and Regional Mercury Cycle: Sources, Fluxes and Mass Balance”. BAYENS W., EBINGHAUS R., VASILIEV O., (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. *NATO ASI Series 2*, 21, 249-272.

MUNTHE J., WÄNGBERG I., PIRRONI N., IVERFELDT Å., FERRARA R., EBINGHAUS R., FENG X., ET AL. (2001): “Intercomparison of methods for sampling and analysis of atmospheric mercury species”, *Atmos. Environ.* 3007-3017.

O'DRISCOLL N.J., BEAUCHAMP S., SICILIANO S.D., RENCZ A.N., LEAN D.R.S. (2003): “Continuous analysis of dissolved gaseous mercury (DGM) and mercury flux in two freshwater lakes in Kejimikujik Park, Nova Scotia: evaluating mercury flux models with quantitative data”, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 2226-2335.

SICILIANO S.D., O'DRISCOLL N.J., LEAN D.R.S. (2002): “Microbial reduction and oxidation of mercury in freshwater lakes”, *Environ. Sci. Technol.*, 36, 3064-3068.

TESSIER E., MONPERRUS M., AMOUROUX D., HERVE P., RUTGER D. W., LEYNAERT A., DONARD O. (2004): “Mercury species distribution in the water column of the Mediterranean Sea during summer 2003”, *RMZ-Mat. Geoenviron.*, 51, 1408-1411.

WANNINKHOF R., MCGILLIS W.R. (1999): “A cubic relationship between air-sea CO₂ exchange and wind speed”, *Geophys. Res. Lett.*, 26, 1889-1892.

Determinazione di fragranze sintetiche in acque di scarico e fanghi di depurazione

a cura di

Stefano Tasselli (*), Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Milano Bicocca - Milano; Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Brugherio (MB)

Licia Guzzella, Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque - Brugherio (MB)

RIASSUNTO

I prodotti per l'igiene personale e la pulizia domestica (Personal Care Products, PCPs) sono largamente utilizzati a livello commerciale e ciò comporta un loro abbondante rilascio nell'ecosistema acquatico. Tra i PCPs vi sono i muschi policiclici (PMFs), profumazioni sintetiche al muschio utilizzate come additivi per la produzione di detersivi, profumi e prodotti per la pulizia domestica. Secondo i report HERA (2008) e ECB (2008), il consumo maggiore di queste sostanze risulta essere localizzato nei paesi del sud Europa, l'Italia al primo posto. Si tratta di fragranze semivolatili e lipofile che sono solo parzialmente degradate dagli impianti di depurazione convenzionali ai quali giungono attraverso la rete fognaria. Le ingenti quantità utilizzate di queste sostanze rendono quindi essenziale una loro maggior conoscenza soprattutto in termini di presenza nell'ambiente. A tal fine, sono stati sviluppati due metodi analitici per la determinazione di quattro fragranze sintetiche e un loro metabolita nelle acque di scarico e nei fanghi attivi di depurazione utilizzando strumentazione semplice e facilmente reperibile. Nei campioni di acqua filtrati, le fragranze sono state estratte mediante SPE e determinate attraverso GC-MS/MS. I campioni di fango attivo sono stati invece estratti attraverso ultrasuoni e analizzati in GC-Ion Trap. I limiti di quantificazione, specifici per ogni composto analizzato e basati sulla contaminazione del laboratorio, sono risultati essere inferiori rispetto alle concentrazioni determinate nei campioni considerati. Le percentuali di recupero sono state maggiori del 70% per ogni composto in entrambe le matrici e il recupero dello standard interno è sempre stato al di sopra del limite di accettabilità (30%).

SUMMARY

Personal Care Products (PCPs) are commercially widely used, determining a continuous discharge into the aquatic ecosystem. PCPs include polycyclic musks (PMFs), synthetic musks used as additives for the production of detergents, perfumes and household cleaning products. According to HERA (2008) and ECB (2008) reports, the highest use of these substances is in the Southern European countries, particularly in Italy. These fragrances are semi-volatile and lipophilic characteristics so that they are only partially degraded by conventional sewage treatment plants. Therefore, the large quantities of these substances used every day make it essential to have a best knowledge, especially in terms of their presence in environment. That's why, two analytical methods were developed for the determination of four synthetic fragrances and one metabolite in wastewater and active sludge using simple and easily available instrumentation. In filtered water samples, fragrances were extracted using SPE system and quantified through GC-MS/MS techniques. Active sludge samples were extracted through ultrasound system and analysed in GC-Ion Trap. The limits of detection, specific to each compound analysed and based on laboratory contamination, were found to be lower than the concentrations determined in the most of samples. Recovery rates were higher than 70% for each compound in both matrices, while the recovery of the internal standard has always been above the acceptability limit (30%).

1. INTRODUZIONE

I Prodotti per la Cura della Persona (PCPs) sono un gruppo di sostanze eterogeneo e di largo utilizzo (Avila e Garcia, 2015). Tra i PCPs vi sono i muschi policiclici (PMFs) come Galaxolide (HHCB), Tonalide (AHTN), Celestolide (ADBI) e Fantolide (AHDI) utilizzati soprattutto nella produzione di profumi, saponi, detersivi e prodotti per la pulizia domestica (Heberer, 2002). Galaxolide e Tonalide sono, tra i PMFs, i più ampiamente utilizzati e rappresentano più del 95% del mercato Europeo di questa classe di composti (Clara et al., 2011) con un consumo medio, stimato nell'anno 2000, rispettivamente di 1427 t a⁻¹ e 358 t

a⁻¹ (OSPAR Commission, 2004). Tra gli Stati Membri dell'Unione Europea si registrano differenze regionali per quanto riguarda il consumo di queste sostanze con valori più alti nel Sud Europa, prima fra tutti l'Italia, in cui sono stati misurati volumi di 7,23 g a⁻¹ pro capite per HHCB e 1,81 g a⁻¹ per AHTN (ECB 2008; HERA 2008). L'utilizzo largamente diffuso dei muschi sintetici comporta un loro rilascio in ambiente in gran parte attraverso gli effluenti degli impianti di depurazione (WWTPs) (Santiago-Morales et al., 2012; Gao et al., 2016). La maggior parte di questi composti non viene rimossa dai trattamenti convenzionali di depurazione e può essere trasportata anche a grandi distanze rispetto alle fonti di inquinamento originarie (Wu et al., 2009; Walters et al., 2010). Di conseguen-

* tasselli@irsa.cnr.it

za, vengono misurate negli effluenti degli impianti di depurazione e nei corpi idrici riceventi concentrazioni di fragranze sintetiche rispettivamente nel range dei $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Questi composti, essendo persistenti in ambiente, possono accumularsi nei sedimenti e nei tessuti lipidici degli organismi acquatici (Daughton e Ternes, 1999; Reiner e Kannan, 2011). Le concentrazioni attualmente misurate nell'ambiente acquatico sono inferiori ai valori di EC50 ottenuti con i test di tossicità acuta ($0,153\text{-}0,83 \text{ mg L}^{-1}$ per HHCB e $0,108\text{-}1,034 \text{ mg L}^{-1}$ per AHTN; US-EPA 2014; Gooding et al., 2006) ma gli organismi acquatici potrebbero essere affetti da un'esposizione cronica alle fragranze sintetiche dovuta al loro continuo rilascio nell'ambiente (Parolini et al., 2015). Negli impianti di depurazione a fanghi attivi è stata inoltre osservata già da Bester nel 2004 la biotrasformazione dell'HHCB nel suo metabolita Galaxolidone (HHCB-lattone). Questo fenomeno viene evidenziato anche dal fatto che mentre le concentrazioni di HHCB e AHTN decrescono durante i trattamenti depurativi, quelle dell'HHCB-lattone sono sempre maggiori negli effluenti rispetto agli affluenti agli impianti. Reiner et al. (2007), ad esempio, hanno misurato concentrazioni di HHCB-lattone da $505\text{-}897 \text{ ng L}^{-1}$ a $1620\text{-}1740 \text{ ng L}^{-1}$ prima e dopo i trattamenti negli impianti di depurazione. In Svizzera, AHTN e HHCB sono state misurate anche nei fanghi attivi in concentrazioni di $2300\text{-}8500 \text{ ng g}^{-1}$ e di $6600\text{-}15000 \text{ ng g}^{-1}$ nel fango proveniente dal digestore finale (Ternes et al., 2005). La digestione dei fanghi negli impianti di depurazione riduce la massa solida del 50-70%, ma non riesce a degradare le fragranze sintetiche. Come conseguenza, il fango proveniente dal digestore risulta essere più contaminato rispetto al fango attivo (Ternes et al., 2005). Anche Yang e Metcalfe (2006), misurando le concentrazioni di AHTN e HHCB nei fanghi attivi, fanghi di ricircolo e fanghi provenienti dal digestore finale di un impianto di depurazione di Peterborough, hanno evidenziato un trend in aumento di concentrazione lungo questa linea. Da qui l'importanza di valutare anche lo stato di contaminazione dei fanghi, soprattutto laddove è previsto un loro riutilizzo come ad esempio in agricoltura.

La continua produzione e utilizzo dei muschi policiclici potrebbero portare, in un futuro sempre più prossimo, ad un aumento considerevole delle concentrazioni negli ambienti acquatici; ecco perché è importante sviluppare protocolli rapidi, efficienti e validati per l'analisi delle PMFs.

Diversi metodi per analizzare le PMFs nelle acque reflue e nei fanghi di depurazione sono stati pubblicati. Per i campioni di acqua, l'estrazione su fase solida (SPE) è la tecnica più utilizzata, spesso seguita da un passaggio di purificazione a seconda della quantità di impurezze presenti nell'estratto. Diverse fasi solide adsorbenti e solventi di eluizione vengono applicati per estrarre le PMFs dalle acque di scarico (He et al., 2013; Chase et al., 2012; Hu et al., 2011). La separazione di fase solido-liquido con solventi organici seguita da una purificazione dell'estratto può essere considerata la classica tecnica di estrazione di questi composti dai campioni di fango. Lo shaking meccanico e l'estrazione a caldo tramite Soxhlet sono anch'esse ampiamente utilizzate (Kupper et al., 2006; Poulsen e Bester, 2010), ma l'utilizzo di grandi quantità di

solventi e il lungo tempo richiesto per l'analisi costituiscono un limite per questi metodi tradizionali.

Obiettivo del presente lavoro è lo sviluppo di metodi rapidi e sensibili per analizzare le PMFs nelle acque di scarico mediante estrazione su fase solida e analisi in GC-MS/MS e nei fanghi di depurazione mediante l'utilizzo di ultrasuoni e successiva quantificazione in GC-Ion Trap.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è stato sviluppato per la determinazione quantitativa di 4 fragranze sintetiche e 1 metabolita in campioni di acque di scarico e fanghi di depurazione. L'estrazione dei campioni da acque reflue è effettuata mediante un sistema SPE che utilizza cartucce discoidali contenenti la fase adsorbente. I campioni vengono precedentemente filtrati su filtri in fibra di vetro per evitare che i solidi sospesi contenuti possano bloccare le cartucce dell'SPE. L'estrazione dai fanghi di depurazione precedentemente liofilizzati viene, invece, svolta mediante un bagno ad ultrasuoni seguito da una purificazione con grafite in polvere non porosa in modo da rimuovere le interferenze presenti nella matrice.

La scelta di metodi di estrazioni semplici e veloci differenti da quelli tradizionali permette inoltre di separare il trattamento delle acque di scarico e dei fanghi da quello dei campioni ambientali (acque di fiumi e laghi, sedimenti) evitando eventuali effetti di contaminazione incrociata tra campioni.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

I due protocolli analitici sviluppati sono applicabili ad acque di scarico e fanghi di depurazione. Queste matrici, diversamente dalle acque superficiali e i sedimenti, presentano sia concentrazioni di fragranze molto elevate, arrivando fino ai $\mu\text{g L}^{-1}$, sia alti livelli di interferenti che potrebbero comportare anche ingenti effetti matrice ed una conseguente errata quantificazione degli analiti. L'utilizzo delle presenti metodiche permette la corretta analisi di questa tipologia di matrici, evitando da un lato problemi quali la saturazione degli strumenti a causa delle alte concentrazioni di analiti e dall'altro anche possibili problemi legati alla presenza di interferenti nelle matrici di origine.

Il metodo sviluppato per l'analisi delle acque reflue prevede la rimozione dei solidi sospesi per filtrazione con filtri in fibra di vetro a $0,7 \mu\text{m}$ in quanto rappresentano in termini di PMFs una massa molto ridotta del campione che risulta non quantificabile analiticamente. Partendo da un volume iniziale di 1 L e concentrando l'estratto a 1 mL (1000x) per quanto riguarda le acque reflue e analizzando 0,2 g di fango di depurazione concentrando l'estratto finale a $800 \mu\text{L}$ si sono raggiunti gli LOD specifici per ogni composto riportati in tabella 5.

4. CAMPIONAMENTO

I campioni di acqua reflua per l'analisi delle fragranze sintetiche devono essere prelevati in modo tale da ottenere un campione omogeneo e rappresentativo

dell'impianto di depurazione analizzato. Per validare il metodo proposto, sono stati prelevati, mediante autocampionatore, campioni d'acqua medi su 24 ore. I campioni dovrebbero essere trasportati in bottiglie di vetro lavate con acetone in laboratorio e risciacquate con il campione durante il prelievo; i campioni vanno filtrati immediatamente con filtri in fibra di vetro a 0,7 μm e conservati a 4 °C in cella frigorifera sino al momento dell'analisi che in ogni caso deve essere inferiore a una settimana. I campioni di fango di depurazione vengono invece prelevati in maniera istantanea, congelati e liofilizzati. Vengono poi conservati a temperatura ambiente in barattoli di vetro ambrato fino al momento dell'analisi.

5. INTERFERENZE

La matrice degli estratti di acque di scarico e soprattutto dei fanghi di depurazione ha una composizione sicuramente complessa e soprattutto ignota. Ciò può produrre un effetto matrice per molti dei composti studiati che può determinarne una quantificazione errata. Per ovviare a questo problema si utilizza uno standard interno marcato che abbia caratteristiche chimico-fisiche simili ai composti analizzati, facilmente distinguibile e soprattutto non presente nel campione originario. Aggiungendo lo standard interno prima della fase di estrazione e assumendo che i composti analizzati si comportino come lo standard interno, si può correggere la quantificazione superando così il problema dell'eventuale effetto matrice.

6. APPARECCHIATURE

- 6.1 Sistema di estrazione SPE;
- 6.2 Gascromatografo;
- 6.3 Spettrometro di massa a triplo quadrupolo;
- 6.4 Spettrometro di massa a trappola ionica;
- 6.5 Cartucce con fase adsorbente C_{18} ($\varnothing = 47$ mm);
- 6.6 Filtri in fibra di vetro di porosità nominale 0,7 μm ($\varnothing = 47$ mm);
- 6.7 Evaporatore in flusso d'azoto;
- 6.8 Pompa da vuoto;
- 6.9 Bagno ad ultrasuoni;
- 6.10 Centrifuga;
- 6.11 Filtri per siringa in fibra di vetro di porosità nominale 1 μm ;
- 6.12 Apparato di filtrazione ;
- 6.13 Liofilizzatore;
- 6.14 Tubi per centrifuga da 50 mL;
- 6.15 Vials per autocampionatore;
- 6.16 Beute in vetro da 250 mL;
- 6.17 Bottiglie in vetro ambrato da 1 L;

7. REAGENTI

- 7.1 Galaxolide, Galaxolidone, Tonalide, Celestolide, Fantolide e Tonalide-d3 con grado di purezza superiore al 97%;

- 7.2 Soluzioni di riferimento dei singoli composti in Isottano (500 mg L^{-1});
- 7.3 Soluzione multicomponente dei composti non marcati in Isottano (1 mg L^{-1} per Celestolide, Phantolide e Tonalide; 5 mg L^{-1} per Galaxolide e Galaxolidone);
- 7.4 Soluzione di standard interno marcato Tonalide-d3 in acetone (20 mg L^{-1});
- 7.5 Soluzioni multicomponenti di riferimento per retta di taratura ottenute diluendo opportunamente le soluzioni del punto 7.3 (1:10, 1:5, 1:2, 1:1) e 7.4 (1:20) in Isottano;
- 7.6 Solventi per "analisi dei residui";
- 7.7 Acqua ultrapura (resistività max 1,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$);
- 7.8 Superclean ENVI-Carb 120/400.

8. METODO

8.1 Estrazione e concentrazione campioni di acqua

È stato utilizzato un sistema di estrazione manuale (6.1) che utilizza cartucce con fase adsorbente C_{18} (6.5) per SPE. Sono stati estratti campioni di 1 L di acque di scarico precedentemente filtrate a 0,7 μm per evitare l'intasamento delle cartucce dovuto alla presenza di solidi sospesi. Prima dell'estrazione, ai campioni sono stati aggiunti 500 ng di standard interno. La metodica di estrazione prevede le seguenti fasi:

- 1) Condizionamento delle cartucce: 10 mL di esano, metanolo e acqua MilliQ;
- 2) Filtrazione sotto vuoto ad una pressione generante un flusso di circa 15 mL min^{-1} ;
- 3) Asciugatura con flusso di aria per 1 ora;
- 4) Eluizione con due successive aliquote di solvente: la prima costituita da 10 mL n-esano:diclorometano (1:1 v/v) e una finale di 10 mL di n-esano. Agli estratti finali viene aggiunto 1 mL di isottano;

L'intera procedura richiede un tempo complessivo di circa due ore. L'acqua residua presente negli estratti può essere eliminata mediante pipetta Pasteur senza interferire con il recupero di analiti estratti. Gli estratti sono concentrati sotto flusso di azoto fino ad un volume finale di 1 mL e trasferiti in vials da autocampionatore per l'analisi in GC.

8.2 Estrazione e concentrazione campioni di fango

Campioni di 0,2 g di fango liofilizzato sono stati estratti in beute di vetro con 20 mL di n-esano:acetone (75:25 v/v) tramite un bagno ad ultrasuoni per 30 min a 30 °C e 40 Hz di intensità. Gli estratti sono stati trasferiti in un tubo da centrifuga, centrifugati a 3000 rpm per 5 min a temperatura ambiente e il surnatante è stato raccolto tramite pipetta Pasteur. Gli estratti sono stati concentrati sotto flusso di azoto a 30 °C fino ad un volume di 5 mL. Gli estratti

sono stati poi trasferiti in tubi da centrifuga ai quali sono stati aggiunti 100 mg di Superclean ENVI-Carb 120/400. Dopo circa 30 sec di vortex, i campioni sono stati nuovamente centrifugati come prima e il surnatante è stato prelevato mediante pipetta Pasteur. Dopo l'aggiunta di 1 mL di isotano, gli estratti sono stati concentrati ad un volume finale di 800 µL, filtrati attraverso un filtro per siringa (6.11) e trasferiti in vials da autocampionatore per l'analisi in GC.

8.3 Analisi in GC-MS/MS dei campioni di acque reflue

Le condizioni operative in GC-MS utilizzate per la validazione del metodo sono elencate nella Tabella 1. Lo spettrometro di massa ha operato in modalità EI. L'identificazione dei composti e dei relativi tempi di ritenzione è stata effettuata in modalità *Full Scan*, mentre la calibrazione e la quantificazione delle fragranze è avvenuta in modalità SRM (*Selected Reaction Monitoring*), utilizzando gli ioni precursori e prodotto caratteristici e le energie di collisione elencati in Tabella 2. L'iniezione del campione è stata effettuata con autocampionatore. Il segnale è stato acquisito e rielaborato tramite software dedicato.

8.4 Analisi in GC-Ion Trap dei campioni di fango

Per quanto riguarda i campioni di fango, le condizioni operative in GC-Ion Trap utilizzate per la validazione del metodo sono elencate nella Tabella 3. Anche in questo caso lo spettrometro di massa ha operato in modalità EI e l'identificazione dei composti e dei relativi tempi di ritenzione è stata effettuata in *Full Scan*, mentre la calibrazione e la quantificazione delle fragranze è avvenuta in modalità SIM (*Selected Ion Monitoring*), utilizzando gli ioni caratteristici elencati in Tabella 4. L'iniezione del campione è stata effettuata con autocampionatore. Il segnale è stato acquisito e rielaborato tramite software dedicato.

Tabella 1. Condizioni cromatografiche per l'analisi delle fragranze in GC-MS/MS.

COLONNA	
SLB®-5ms, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm	
INIETTORE	
Modalità	Splitless
Temperatura iniziale	50 °C
Rampa	1 °C min ⁻¹
Temperatura finale	200 °C
Volume iniettato	2 µL
GAS DI TRASPORTO	
Elio	
Flusso 1	1,3 mL min ⁻¹
Tempo 1	10 min
Flusso 2	1,5 mL min ⁻¹
Tempo 2	20 min
GAS DI COLLISIONE	
Argon	
FORNO	
Temperatura iniziale	50 °C
Tempo iniziale	1 min
Rampa 1	12 °C min ⁻¹
Temperatura 1	170 °C
Rampa 2	6 °C min ⁻¹
Temperatura 2	230 °C
Tempo 2	3 min
Rampa 3	20 °C min ⁻¹
Temperatura 3	290 °C
Tempo 3	3 min
SPETTROMETRO DI MASSA	
Temperatura transfer line	290 °C
Temperatura sorgente	290 °C
Ionizzazione elettronica	70 eV

Tabella 2. Nome, formula chimica, tempo di ritenzione, ioni ed energie di collisione delle fragranze usate per la quantificazione in GC-MS/MS.

Nome	Formula	T _R (min)	Ioni precursori (m z ⁻¹)	Ioni prodotto (m z ⁻¹)	Energia di collisione (eV)
Celestolide (ADBI)	C ₁₇ H ₂₄ O	20.18	244,1 229,1	229,2 173,1	10 5
Galaxolide (HHCB)	C ₁₈ H ₂₆ O	22.48	243,1 213,1	213,1 171,1	10 10
Galaxolidone (HHCB-lattone)	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	27.64	258,1 257,1	240,2 239,2	10 10
Fantolide (AHDl)	C ₁₇ H ₂₄ O	20.87	244,2 229,1	229,2 187,1	10 5
Tonalide (AHTN)	C ₁₈ H ₂₆ O	22.57	243,1 243,1	187,1 159,1	5 10

Tabella 3. Condizioni cromatografiche per l'analisi delle fragranze in GC-Ion Trap.

COLONNA	
SLB®-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	
INIETTORE	
Modalità	Split
Rapporto di splittaggio	8
Temperatura iniziale	50 °C
Rampa	1 °C min ⁻¹
Temperatura finale	200 °C
Volume iniettato	2 µL
GAS DI TRASPORTO	
Flusso costante	1,3 mL min ⁻¹
FORNO	
Temperatura iniziale	50 °C
Tempo iniziale	1 min
Rampa 1	12 °C min ⁻¹
Temperatura 1	170 °C
Rampa 2	6 °C min ⁻¹
Temperatura 2	230 °C
Tempo 2	20 min
Rampa di pulizia	25 °C min ⁻¹
Temperatura	310 °C
Tempo	5 min
SPETTROMETRO DI MASSA	
Temperatura transfer line	300 °C
Temperatura sorgente	250 °C
Ionizzazione elettronica	70 eV

8.5 Validazione del metodo analitico

8.5.1 Linearità

La linearità della risposta strumentale ai composti considerati è stata determinata attraverso soluzioni standard in isotano in un intervallo di concentrazione da 0,1 a 5 mg L⁻¹, corrispondente al range di concen-

trazione ritrovato nei campioni di acque di scarico. La quantificazione di ogni analita negli estratti è stata condotta per mezzo di una specifica retta di taratura a 4 punti, forzata per l'origine. I dati di calibrazione con i rispettivi R² sono riportati in Tabella 5.

8.5.2 Limiti di rilevabilità e di quantificazione

Data la contaminazione preesistente in laboratorio dovuta all'utilizzo di prodotti per la pulizia contenenti fragranze, per la determinazione del limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono state considerate la media (µ) e la deviazione standard (σ) di quattro campioni di bianco (acqua Milli-Q) secondo quanto previsto dalla Direttiva sul monitoraggio delle acque (EU 2009):

$$LOD = \mu + 3 \cdot \sigma$$

$$LOQ = \mu + 10 \cdot \sigma$$

I limiti di rilevabilità e di quantificazione di entrambi i metodi analitici sono riportati in Tabella 5.

8.5.3 Ripetibilità del metodo

La ripetibilità strumentale è stata valutata effettuando l'analisi dello stesso campione 10 volte mediante autocampionatore e calcolando la deviazione standard relativa (R.S.D.) per ciascun composto. I risultati sono riportati in tabella 6. L' R.S.D. di AHDI risulta essere elevato nei campioni di acqua poiché è stata rilevata soltanto in tracce mentre nel fango non è stata mai trovata.

La ripetibilità dell'intera procedura analitica è stata invece determinata mediante l'analisi di quattro repliche di un campione di acqua di scarico prelevato all'ingresso di un impianto di depurazione e di un campione di fango attivo. È stato infine calcolato il Coefficiente di Variazione Relativo di ogni composto, definito come il rapporto tra la deviazione standard σ e la media µ (Everitt, 1998). Il coefficiente di variazione è uno strumento statistico molto utile per confrontare il grado di variazione tra due o più serie di dati, anche se le medie differiscono drasticamente tra di

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

Nome	T _R (min)	Ioni (m z ⁻¹)	Energia di collisione (eV)
Celestolide (ADBI)	14,72	188,1; 229,1	1,4
Galaxolide (HHCB)	16,63	213,1	1,6
Galaxolidone (HHCB-lattone)	21,35	201,1; 213,2; 215,1; 239,1	1,5
Fantolide (AHDI)	15,29	131,1; 145,1; 159,1; 173,1; 185,1; 187,1; 201,2; 214	1,6
Tonalide (AHTN)	16,74	157,1; 171,1; 185,1; 187,1; 201; 225,1	1,5

Tabella 5. Dati di calibrazione, limiti di rilevabilità e di quantificazione (rispettivamente LOD e LOQ) dei metodi analitici.

Composto	Dati di calibrazione				Acqua (ng L ⁻¹)		Fango (ng g ⁻¹)	
	GC-MS/MS		GC-Ion Trap		LOD	LOQ	LOD	LOQ
	Equazione	R ²	Equazione	R ²				
Celestolide (ADBI)	y=1,614x	0,997	y=1,183x	0,997	2,4	6,3	0,1	1
Galaxolide (HHCb)	y=2,181x	0,997	y=2,474x	0,999	61	124	210	526
Galaxolidone (HHCb-lattone)	y=0,923x	0,996	y=4,706x	0,999	39	90	56	120
Fantolide (AHDl)	y=1,756x	0,998	y=2,142x	0,999	1,7	5	0,1	1
Tonalide (AHTN)	y=1,386x	0,999	y=0,935x	0,997	80	137	67	137

Tabella 6. Ripetibilità dei due metodi strumentali. I valori di R.S.D. sono espressi in %.

Composto	GC-MS/MS (acqua)	GC-Ion Trap (fango)
ADBI	1,75	13,65
HHCb	1,80	7,84
HHCb-lattone	4,00	3,81
AHDl	31,24	Non effettuata
AHTN	2,08	10,28

loro. In generale, un CV ≤0,1 corrisponde ad una variabilità debole; 0,1 < CV < 1 corrisponde ad una variabilità moderata; e CV ≥ 1 corrisponde ad una forte variabilità. In tabella 7 sono elencati i risultati di ripetibilità dell'intero metodo analitico. I valori ottenuti mostrano una variabilità limitata per tutti i composti in entrambi i metodi. Soltanto l'analisi di AHTN rivela una moderata variabilità nei campioni di fango. La ripetibilità di AHDl non è stata calcolata in quanto i valori misurati sono stati sempre < LOD.

8.5.4 Prove di recupero

Per le analisi sull' acqua, campioni di 1 L di milli-Q sono stati fortificati con 100 ng L⁻¹ di ADBI, AHDl e AHTN e con 500 ng L⁻¹ di HHCb e HHCb-lattone in modo da simulare un campione reale di acqua di scarico in termini di concentrazione relativa degli analiti. Quattro repliche da 1L di acqua Milli-Q sono state utilizzate per valutare i differenti recuperi chimici. 500 ng di standard interno AHTN-D3 sono stati aggiunti ad ogni campione prima dell'estrazione. I valori di recupero sono stati considerati accettabili se il re-

cupero dello standard interno era >30% e le concentrazioni rilevate degli analiti erano nell'intervallo 50-150% rispetto a quelle attese. I risultati dei recuperi sono elencati in tabella 8. Per quanto riguarda le analisi sul fango, quattro repliche estrattive sono state effettuate su aliquote dello stesso campione, utilizzando lo standard interno AHTN-D3 come riferimento per la valutazione dei recuperi degli analiti. Le percentuali di recupero di AHTN-D3 sono state sempre superiori al 77%.

CONCLUSIONI

Due metodi rapidi e sensibili sono stati sviluppati al fine di analizzare le fragranze sintetiche in campioni di acque di scarico e fanghi di depurazione; per i campioni di acqua è stata utilizzata un'estrazione su fase solida seguita da quantificazione in GC-MS/MS mentre per i fanghi di depurazione è stata applicata un'estrazione in bagno ad ultrasuoni con un successivo passaggio di purificazione ed una quantificazione mediante GC-Ion Trap. Utilizzando questi protocolli analitici sono stati ottenuti recuperi elevati di tutti i composti analizzati nonostante la presenza di numerose impurità nella matrice originale dei campioni. I metodi hanno permesso di raggiungere bassi valori di LOD e LOQ rispetto alle concentrazioni rilevate nei campioni reali. I metodi proposti evidenziano alcuni importanti vantaggi rispetto ai metodi già in uso per l'analisi di questi composti, come ad esempio la riduzione del tempo di analisi, la quantità di reagenti utilizzata e infine l'utilizzo di una strumentazione semplice e facile da reperire. Considerando i campioni di acqua di scarico, il metodo proposto è stato modificato da quello sviluppato da Hu et al. (2011) diminuendo la quantità di solventi impiegata. Per i campioni di fango, l'utilizzo di un bagno ad ultrasuoni invece di altre tecniche di estrazione ha permesso di ridurre la

Tabella 7. Ripetibilità del metodo analitico per i campioni di acqua e di fango. I valori sono espressi in ng L⁻¹ per i campioni di acqua e in ng g⁻¹ per i campioni di fango.

Composto	Acqua					Fango (ng g ⁻¹)				
	A	B	C	D	CV ^a	A	B	C	D	CV ^a
Celestolide (ADBI)	9,6	9,1	8,5	10,4	0,09	90	97	105	100	0,06
Galaxolide (HHCb)	2421	2505	2279	2543	0,05	18590	19287	20457	17007	0,08
Galaxolidone (HHCb-lattone)	589	533	495	595	0,09	3047	3212	3472	3104	0,06
Fantolide (AHDl)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Tonalide (AHTN)	236	236	221	241	0,04	1246	1446	1338	1028	0,14

Tabella 8. Valori di recupero nei campioni di acqua. I valori sono espressi in percentuale .

Nome	A	B	C	D	Media
Celestolide (ADBI)	73,81	95,53	63,20	88,85	80,35
Galaxolide (HHCB)	86,12	>100	54,02	96,40	84,13
Galaxolidone (HHCB-lattone)	>100	>100	80,65	>100	95,16
Fantolide (AHDl)	78,48	97,91	63,97	94,12	83,6
Tonalide (AHTN)	56,78	63,98	93,79	69,65	71,05

quantità di solvente impiegata (20 mL), il tempo di estrazione (30 min) e ha permesso di evitare la cross-contaminazione tra i campioni. Ad esempio, Shek et al. (2008) hanno analizzato le fragranze sintetiche nel fango utilizzando il Soxhlet con un tempo di estrazione di 10 ore ed un consumo di solvente pari a 400 mL per campione, mentre Clara et al. (2011) hanno condotto l'estrazione in uno shaker rotante due volte per 150 min. Quando si analizzano matrici complesse e sconosciute come le acque di scarico e soprattutto i fanghi, l'utilizzo di strumentazione semplice, economica e dedicata è da preferirsi in modo da evitare una contaminazione diffusa del laboratorio e delle apparecchiature presenti.

BIBLIOGRAFIA

ÁVILA C., GARCÍA J. (2015): "Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment and their removal from wastewater through constructed wetlands", *Compr. Anal. Chem.*, 67, 195-244.

BESTER K. (2004): "Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant", *Chemosphere*, 57, 863-870.

CHASE D.A., KARNJANAPIBOONWONG A., FANG Y., COBB G.P., MORSE A.N., ANDERSON T.A. (2012): "Occurrence of synthetic musk fragrances in effluent and non-effluent impacted environments", *Sci. Total Environ.*, 416, 253-260.

CLARA M., GANS O., WINDHOFER G., KRENN U., HARTL W., BRAUN K., SCHARF S., SCHEFFKNECHT C. (2011): "Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment", *Chemosphere*, 82, 1116-1123.

DAUGHTON C.G., TERNES T.A. (1999): "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?", *Environ. Health Perspect.*, 107, 907.

E.C.B. (EUROPEAN CHEMICAL BUREAU) (2008): "European Union risk assessment report. 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8-HexamethylCyclopenta- γ -2-Benzopyran(1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-Hexamethylin-Deno[5,6-C]Pyran - HHCB)", <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/home.php>

RINGRAZIAMENTI

Questa attività è stata svolta nel quadro del Progetto PerFORM WATER 2030 finanziato nell'ambito del POR (Programma Operativo Regionale) FESR (Fondo Europeo di Sviluppo Regionale) 2014-2020 e della Call d'innovazione "Accordi per la Ricerca e l'Innovazione" di Regione Lombardia.

EU (2009): "Guidance on surface water chemical monitoring under the Water Framework Directive. Guidance document No. 19. Commission implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC)", Technical report 2009-025.

EVERITT B.S. (1998): "The Cambridge Dictionary of Statistics", Cambridge University Press, Cambridge, UK New York. ISBN 0 521 81099.

GAO Y., JI Y., LI G., MAI B., AN T. (2016): "Bioaccumulation and ecotoxicity increase during indirect photochemical transformation of polycyclic musk tonalide: A modeling study", *Water Res.*, 105, 47-55.

GOODING M.P., NEWTON T.J., BARTSCH M.R., HORNBUCKLE K.C. (2006): "Toxicity of synthetic musks to early life stages of the freshwater mussel *Lampsilis cardium*", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 549-558.

HE Y.J., CHEN W., ZHENG X.Y., WANG X.N., HUANG X. (2013): "Fate and removal of typical pharmaceuticals and personal care products by three different treatment processes", *Sci. Total Environ.*, 447, 248-254.

HEBERER T. (2002): "Occurrence, fate, and assessment of polycyclic musk residues in the aquatic environment of urban areas—a review", *Acta Hydroch. Hydro.*, 30, 227-243.

- H.E.R.A. (HUMAN AND ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT ON INGREDIENTS OF HOUSEHOLD CLEANING PRODUCTS) (2008): "Polycyclic musks AHTN (CAS 1506-02-1) and HHCB (CAS 1222-05-05)", <http://www.heraproject.com/files/28-E-36551E10-F8EFE807-E4199B9BB0076A9F.pdf>
- HU Z., SHI Y., ZHANG S., NIU H., CAI Y. (2011): "Assessment of synthetic musk fragrances in seven wastewater treatment plants of Beijing, China", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 302-306.
- KUPPER T., PLAGELLAT C., BRÄNDLI R.C., DE ALENCASTRO L.F., GRANDJEAN D., TARRADELLAS J. (2006): "Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment", *Water Res.*, 40, 2603-2612.
- O.S.P.A.R. COMMISSION (2004): "Hazardous substances series, musk xylene and other musks", London, UK, OSPAR Secretariat, ISBN 1-904426-36-0.
- PAROLINI M., MAGNI S., TRAVERSI I., VILLA S., FINIZIO A., BINELLI A. (2015): "Environmentally relevant concentrations of galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) induced oxidative and genetic damage in *Dreissena polymorpha*", *J. Hazard. Mater.*, 285, 1-10.
- POULSEN T.G., BESTER K. (2010): "Organic micropollutant degradation in sewage sludge during composting under thermophilic conditions", *Environ. Sci. Technol.* 44, 5086-5091.
- REINER J.L., BERSSET J.D., KANNAN K. (2007): "Mass flow of polycyclic musks in two wastewater treatment plants", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 52, 451-457.
- REINER J.L., KANNAN K. (2011): "Polycyclic musks in water, sediment, and fishes from the upper Hudson River, New York, USA", *Water Air Soil Pollut.*, 214, 335-342.
- SANTIAGO-MORALES J., GÓMEZ M.J., HERRERA S., FERNÁNDEZ-ALBA A.R., GARCÍA-CALVO E., ROSAL R. (2012): "Oxidative and photochemical processes for the removal of galaxolide and tonalide from wastewater", *Water Res.*, 46, 4435-4447.
- SHEK W.M., MURPHY M.B., LAM J.C., LAM P.K. (2008): "Synthetic polycyclic musks in Hong Kong sewage sludge", *Chemosphere*, 71, 1241-1250.
- TERNES T.A., BONERZ M., HERRMANN N., LÖFFLER D., KELLER E., LACIDA B.B., ALDER A.C. (2005): "Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC tandem MS and GC/MS", *J. Chromatogr. A*, 1067, 213-223.
- US-EPA (2014): "TSCA Work Plan Chemical Risk Assessment HHCB 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta-g-2- benzopyran", https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/hhcb_wp_ra_final_08_27_14.pdf
- WALTERS E., MCCLELLAN K., HALDEN R. (2010): "Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms", *Water Res.*, 44, 6011-6020.
- WU C., WITTER J.D., SPONGBERG A.L., CZAJKOWSKI K.P. (2009): "Occurrence of selected pharmaceuticals in an agricultural landscape, Western Lake Erie Basin", *Water Res.*, 43, 3407-3416.
- YANG J.J., METCALFE C.D. (2006): "Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids", *Sci. Total. Environ.*, 363, 149-165.

Valutazione della qualità dei sedimenti marini e salmastri con il Crostaceo Anfipode *Gammarus aequicauda*

a cura di

Ermelinda Prato (*), Francesca Biandolino, *Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR, Taranto*

RIASSUNTO

Per la valutazione della qualità dei sedimenti marini e salmastri l'approccio chimico è sempre più spesso integrato da quello ecotossicologico che si avvale dell'uso di test o saggi biologici. Il saggio ecotossicologico ha lo scopo di verificare se un campione ambientale causa un effetto significativo negli organismi utilizzati per il test. Scopo del presente contributo è la descrizione dettagliata di un protocollo metodologico per la conduzione di saggi biologici con il crostaceo anfipode *Gammarus aequicauda*, specie epibentica molto diffusa nel Mar Mediterraneo. L'idoneità di questa specie nell'impiego nei saggi biologici è stata ampiamente valutata in diversi contesti ambientali. Gli organismi da utilizzare per il test devono essere in età pre-riproduttiva, corrispondenti alle dimensioni di 2- 4 mm. Sono riportate le metodologie di campionamento e acclimatazione degli organismi alle condizioni del test in laboratorio. Sono riportati i protocolli relativi al test di tossicità acuta con un tossico di riferimento (controllo positivo) e con i sedimenti. I risultati dei saggi sono giudicati accettabili se al termine del periodo di esposizione la sopravvivenza degli organismi di controllo è $\geq 80\%$. I risultati possono essere espressi o come percentuale di individui morti o come valore di LC_{50} , cioè come concentrazione della sostanza tossica che determina la morte del 50% degli individui impiegati nel test.

SUMMARY

For the assessment of the quality of marine and brackish sediments, the chemical approach is increasingly integrated with the ecotoxicological one, by use of bioassays. The aim of the ecotoxicological assay is to verify whether an environmental sample causes a significant effect in the organisms used for the test. The purpose of this work is the detailed description of a methodological protocol for conducting biological assays with the crustacean amphipod *Gammarus aequicauda*, a widespread epibenthic species in the Mediterranean Sea. The suitability of this species for use in bioassays has been widely evaluated in various environmental contexts. The organisms for the test must be of a pre-reproductive age, corresponding to the size of 2-4 mm. The methods of sampling and acclimatization of the organisms to the laboratory conditions of the test are reported. Protocols relating to the acute toxicity test with a reference toxic (positive control) and with the sediments are reported. The results of the tests are considered acceptable if at the end of the exposure period the survival of the control organisms is $\geq 80\%$. The results can be expressed either as a percentage of dead individuals or as an LC_{50} value, as a concentration of the toxic substance that determines the death of 50% of the individuals employed in the test.

1. INTRODUZIONE

I sedimenti marini rappresentano un comparto ambientale di notevole importanza e hanno un ruolo fondamentale sia nell'accumulo degli inquinanti, provenienti dalla colonna d'acqua, che nella loro mobilitazione, rendendoli disponibili al comparto biotico. Molti degli inquinanti sono bioaccumulabili e fortemente persistenti nell'ambiente a causa della loro ridottissima biodegradabilità. Numerosi studi hanno fornito evidenza sperimentale che il solo approccio chimico-analitico non fornisce gli strumenti sufficienti per definire il rischio ambientale associato ad una miscela di inquinanti. L'ecotossicologia può fornire importanti contributi nel monitoraggio ambientale attraverso la determinazione delle soglie ecologiche critiche, necessarie per la protezione del capitale naturale. Gli strumenti di cui dispone sono i test di tossicità, che consentono di valutare la frazione biodisponibile degli inquinanti, singolarmente ed in miscela per gli organismi viventi. I test consistono nell'esposizione di organismi (specie test), a campioni naturali (acqua, reflui

urbani, sedimento, suolo, ecc.) o a soluzioni di sostanze tossiche note, al fine di valutarne gli eventuali effetti e il rischio relativo a scenari espositivi sito-specifici. (Volpi Ghirardini e Pellegrini, 2001).

L'esistenza di diversi approcci ma l'assenza di metodi standardizzati (ISO, ASTM o OCSE) con le specie test è un gap cruciale che necessita di essere colmato.

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. Ciascun bioindicatore presenta, infatti, una particolare caratteristica che può essere in parte vantaggiosa ai fini dell'esecuzione del test ecotossicologico e della sua attendibilità. Un buon bioindicatore deve possedere un'elevata sensibilità agli inquinanti, un'ampia distribuzione nell'area di indagine, un'elevata rilevanza ecologica, una buona tolleranza ai parametri chimico-fisici (temperatura, salinità, pH, granulometria), facilità di reperimento, disponibilità durante l'anno, facilità di mantenimento in laboratorio.

* linda.prato@irsa.cnr.it

Gammarus aequicauda è un crostaceo anfipode spesso usato come specie test nella valutazione della qualità dei sedimenti marini ed estuarini (Fig. 1). È una specie epibentica molto diffusa nel Mar Mediterraneo, vive sotto le pietre o tra le alghe in acque costiere e sistemi lagunari poco profondi, fino a una profondità di circa 20 m, di solito in località con influenza d'acqua dolce. Ha un'alimentazione di tipo onnivoro costituito da macroalghe e detrito organico che ricava "grattando" la superficie dei granuli di sedimento. Riveste un ruolo chiave lungo la catena trofica, in quanto connette i flussi energetici tra i produttori primari (alghe, fanerogame) ed i consumatori dei livelli superiori (es. pesci).

L'idoneità di questa specie nell'impiego nei saggi biologici è stata ampiamente valutata in diversi contesti ambientali in termini di adattabilità alle condizioni test e di sensibilità specifica. Numerosi esperimenti di laboratorio hanno mostrato una buona acclimatazione alle condizioni di test, un'alta sensibilità ai riferimenti tossici, una elevata tolleranza a variabili ambientali come la temperatura, la salinità e una sensibilità relativamente elevata ai contaminanti (Prato e Biantolino, 2005; Prato et al., 2006; Annichiarico et al., 2007; Prato et al., 2008; Prato e Biantolino, 2009; Prato et al., 2009; Narracci et al., 2009).



Figura 1. *Gammarus aequicauda*.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta di sedimenti o estratti provenienti da ambienti marini e/o salmastri consente di identificare sorgenti di contaminazione capaci di provocare effetti tossici acuti nella specie test e permette di quantificare la potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale in grado di determinare la morte del 50% degli organismi utilizzati nel test (LC₅₀) durante un dato tempo di esposizione. I risultati ottenibili da un saggio acuto costituiscono solitamente il primo passo nella valutazione del rischio per la vita acquatica. L'assenza di effetti acuti non preclude la possibilità di effetti cronici.

3. CAMPIONAMENTO E ACCLIMATAZIONE DEGLI ORGANISMI

Il campionamento degli animali deve essere effettuato in una zona costiera scelta accuratamente, lontana da contaminazioni antropiche. *G. aequicauda* vive su fondi mobili, si rinviene facilmente nei primi cm di acqua (da 0 a 30 cm) tra *Chaetomorpha linum*, *Enteromorpha intestinalis* e *Ulva* ssp, ed è possibile trovarla facilmente anche sotto le pietre o sulla superficie del sedimento. Il sedimento raccolto, viene setacciato in campo (500 µm) e gli organismi trattenuti sono introdotti in un contenitore e trasportati tempestivamente in laboratorio dove saranno trasferiti in un acquario, (o vascone), insieme al sedimento nativo (uno strato di 2-3 cm), alle macroalghe e all'acqua proveniente dal sito di prelievo. Durante il periodo di acclimatazione (2-3 giorni circa) è necessaria una continua areazione, con areatori elettrici, senza creare turbolenze, per garantire un livello di ossigeno disciolto >80%. Gli organismi sono tenuti in una camera termostata, alla temperatura e salinità registrate al momento del prelievo e fotoperiodo 16L:8B (luce: buio) con luce bianca a 1400 lux. Il mantenimento della temperatura dell'acqua nelle vasche di stabulazione in questa prima fase uguale a quella presente nel sito di prelievo evita l'insorgere di shock termici.

Dal secondo giorno, essi verranno gradualmente portati alle condizioni standard di laboratorio per l'esecuzione del test di tossicità: 16 ± 2 °C e 36‰ di salinità. Questa operazione risulta importante soprattutto nei periodi estivi e invernali; per correggere la salinità, nel caso sia più bassa, sarà sufficiente aggiungere un'aliquota di acqua di mare filtrata (0,45 µm) a una più alta salinità. Nel caso di una salinità più elevata sarà invece necessario aggiungere acqua distillata. Questa operazione dovrà provvedere ad un incremento o diminuzione di salinità di ~ 3-5‰ al giorno. Il graduale adattamento alla temperatura standard prevede un incremento o diminuzione di ~3 °C al giorno. Raggiunte le condizioni standard gli organismi verranno lasciati riposare per due giorni.

4. SOLUZIONI, STRUMENTAZIONE E MATERIALI

4.1 Acqua

Per la preparazione dei controlli positivi (con un tossico di riferimento), controlli negativi (con solo acqua di mare), delle soluzioni della sostanza da sottoporre alla prova e per la raccolta e/o diluizione degli organismi, 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 (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.

4.2 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 crostacei, è il nitrato di cadmio partendo da una soluzione madre di $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, (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.

4.3 Carte di controllo

E' consigliabile la conduzione periodica di test (controllo positivo) in condizioni standard con un tossico di riferimento. Ciò permette di avere a disposizione delle carte di controllo per valutare l'affidabilità delle condizioni in cui è stato eseguito un saggio ecotossicologico, in quanto prevede la registrazione cronologica e grafica dei valori ottenuti e quelli della sua variabilità. Questa pratica fa sì che sia disponibile un'ampia serie di valori di LC_{50} del tossico prescelto, permettendo di verificare se la risposta di una specie test in un saggio di tossicità è confrontabile con quella normalmente riscontrata nei saggi dello stesso tipo effettuati in precedenza nello stesso laboratorio di prova con lo stesso protocollo metodologico (UNI ISO 7870, 2014a-e). In condizioni normali, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio delle precedenti LC_{50} (media ± 2). Viceversa, se la LC_{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. 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).

5. STRUMENTAZIONE

In aggiunta alle usuali apparecchiature da laboratorio sono necessari:

- 5.1 acquari dotati di un appropriato sistema di filtraggio ed areazione per l'acclimatazione degli organismi;
- 5.2 camera termostata 16 ± 2 °C;
- 5.3 pompa a vuoto per la filtrazione dell'acqua ;
- 5.4 salinometro;
- 5.5 termometro;
- 5.6 pH-metro;
- 5.7 ossimetro;

- 5.8 microscopio ottico per il controllo per la lettura dei campioni (obiettivi 4x, 10x e 40x);
- 5.9 micropipette automatiche e/o manuali graduate da 0,10 mL a 5,00 mL;
- 5.10 sistema di filtrazione a bicchiere per il filtraggio dell'acqua di mare;

6. MATERIALI

- 6.1 Contenitori per il trasporto degli organismi;
- 6.2 Vassoi/vaschette per usi generali di laboratorio;
- 6.3 carta bibula;
- 6.4 setacci ASTM;
- 6.5 vetrini orologio;
- 6.6 pipette Pasteur in plastica da 2 mL;
- 6.7 pipette Pasteur in vetro 7 x 230 mm;
- 6.8 beakers in vetro borosilicato da 50, 500 e 1000mL;
- 6.9 filtro in nitrocellulosa con porosità di 0,45 μm ;
- 6.10 Parafilm.

7. PROTOCOLLO METODOLOGICO

7.1 Selezione degli organismi

Gli organismi da utilizzare per il test devono essere in età pre-riproduttiva, corrispondenti alle dimensioni di 2- 4 mm. La selezione verrà effettuata tramite setacciatura. Una parte del sedimento contenuto nell'acquario di acclimatazione verrà messo in una bacinella più piccola contenente acqua di mare. Agitando delicatamente, gli anfipodi tenderanno ad andare in superficie. Versando l'acqua di mare attraverso una serie di setacci (1000- 500- 250 μm) si potrà ottenere una selezione della taglia degli organismi. Questa operazione verrà ripetuta con il resto del sedimento fino a quando tutti gli animali saranno recuperati.

Per il test verranno utilizzati gli organismi trattenuti sul setaccio di 500 μm , che saranno raccolti in una vaschetta contenente acqua alla salinità del test (36 ± 1 ‰). Ciò è indispensabile per ottenere individui di taglia omogenea con sensibilità simile, saranno eliminati organismi giovani e di grande taglia (adulti e femmine ovigere). Infatti, uno studio su *G. aequicauda* (Prato & Biandolino, 2005) ha evidenziato che la taglia influenza la sensibilità: gli adulti sono meno sensibili degli individui pre-riproduttivi.

7.2 Allestimento del test acuto

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

- il controllo positivo, rappresentato da concentrazioni crescenti della sostanza tossica di riferimento;
- la matrice ambientale o altre soluzioni da testare;

- il controllo negativo: con sola acqua di mare (naturale o artificiale).

Durante l'esecuzione dei tests, i beakers con gli organismi verranno continuamente aerati e mantenuti alla temperatura di $16 \pm 2^\circ\text{C}$, salinità di $36 \pm 1\text{‰}$ e luce continua. Agli individui non verrà fornito alcun cibo. Inoltre per ridurre l'evaporazione della soluzione è consigliabile coprire ogni beaker con un vetrino d'orologio o con una pellicola (opportunamente forata).

7.3 Esecuzione del test con il tossico di riferimento

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

Le concentrazioni comunemente utilizzate ed idonee all'individuazione dell' LC_{50} , per il *G. aequicauda*, con il nitrato di Cadmio $Cd(NO_3)_2$ sono: 0- 0,2- 0,4- 0,8- 1,6 -3,2 mg L^{-1} (Prato e Biandolino, 2005; Prato et al., 2006; Prato e Biandolino, 2009; Narracci et al., 2009).

Alla prova occorre aggiungere il controllo negativo in acqua di mare filtrata a $0,45\ \mu\text{m}$ (FSW), corrispondente alla concentrazione $0\ \text{mg L}^{-1}$.

Gli esemplari di *G. aequicauda* sono prelevati con una pipetta Pasteur rovesciata (per evitare di danneggiare gli organismi) e suddivisi in maniera random in sub campioni. In questa fase verranno utilizzati beakers da 50 mL contenenti acqua di mare, in numero di 15 (4 concentrazioni + 1 controllo X 3 repliche = 15 contenitori).

In ogni contenitore sono inseriti 20 organismi, per favorire una raccolta random è consigliabile non introdurre gli anfipodi contemporaneamente nello stesso contenitore, ma inserire gli organismi pochi per volta (1 o 2 organismi) in più beakers, in questo modo sarà assicurata la raccolta delle unità in modo casuale. Il test avrà la durata di 96 h e verrà condotto all'interno di beaker da 1000 mL. Ogni beaker verrà riempito con 500 mL di soluzione acquosa con il tossico di riferimento preparati precedentemente alle diverse concentrazioni. Gli organismi verranno prelevati uno alla volta e inseriti in numero di 20 in ogni beaker (15 beakers), facendo molta attenzione a non inserire acqua per non alterare la concentrazione del tossico.

7.4 Termine del test

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

7.5 Analisi dei dati

I dati verranno trattati statisticamente per il calcolo dell' LC_{50} alle 96h con il Trimmed Spearman - Karber Method (TSK) (Hamilton et al., 1977) che fornirà valori mediani di efficacia con i limiti fiduciali al 95%.

Tabella 1. Tabella riassuntiva del test di tossicità con il tossico di riferimento.

Parametri	Test con il tossico di riferimento $Cd(NO_3)_2$
Tipo di Test	Statico
Temperatura	$16 \pm 2^\circ\text{C}$
Illuminazione	1400 lux
Fotoperiodo	24 h di luce
Ossigeno Disciolto	Aerazione costante
Salinità	$36 \pm 1\text{‰}$
Acqua di diluizione	Naturale filtrata $0,45\ \mu\text{m}$
Range di concentrazioni	0-0,2-0,4-0,8-1,6-3,2 mg L^{-1}
N° di Repliche	3
N° di organismi per replica	20
Durata del test	96h
End-point	Mortalità
Analisi dei dati	LC_{50} (TSK)

7.6 Procedura del saggio biologico sui sedimenti

Il test di tossicità acuta, su sedimenti "tal quali", con *G. aequicauda* si basa in gran parte sulle linee guida per i test di tossicità acuta su sedimenti con anfipodi marini-estuarini (ASTM 1992; SETAC 1993; ISO 2005). I saggi biologici sono applicati al sedimento fresco, conservato a $4-6^\circ\text{C}$ per non oltre 10 giorni dal campionamento, salvo diverse indicazioni riportate negli specifici protocolli standardizzati (Dillon et al., 1994; Carr e Chapman, 1995).

I campioni di sedimento per i quali è prevista una valutazione ecotossicologica sono privati di ogni componente di origine antropica (plastica, vetro, metallo, ecc.) e del macrobenthos presente.

I sedimenti verranno introdotti all'interno di beaker da 1000 mL (2-3 cm di sedimento da testare) con l'aggiunta di 750 mL di acqua di mare filtrata ($0,45\ \mu\text{m}$) (Fig. 2).

Ogni campione verrà mantenuto alla temperatura del test ($16 \pm 2^\circ\text{C}$) e ossigenato per 24h prima che gli organismi vengano introdotti affinché le due matrici (sedimento e acqua) si equilibrano (De Witt et al., 1989). Le stesse procedure verranno adottate anche per il sedimento di controllo. Dopo le 24h, dall'acquario di stabulazione gli anfipodi vengono trasferiti (20 individui) nei beakers, con la stessa metodologia descritta per il test con il tossico di riferimento. Sono utilizzati solo organismi in buona salute (attivi e sani). Durante il test, della durata di 10 giorni, i beakers sono continuamente aerati attraverso la punta di una pipetta di vetro posta almeno 1 cm sopra la superficie del sedimento per evitare di disturbare gli animali, e mantenuti a $16 \pm 2^\circ\text{C}$ con luce continua. I parametri di qualità dell'acqua (ossigeno disciolto, salinità e pH) sono misurati all'inizio e alla fine del test, per assicu-

rare che tutte le repliche e i trattamenti siano nelle medesime condizioni. Agli individui non verrà fornito alcun cibo. Inoltre per ridurre l'evaporazione della soluzione è consigliabile coprire i beakers con un vetrino d'orologio o con una pellicola.

7.7 Termine del test

Al termine dei 10 giorni, i sedimenti verranno setacciati per recuperare gli organismi. Saranno considerati morti tutti gli organismi che non mostreranno alcun movimento anche dopo una leggera stimolazione e gli individui che non si ritrovano più nel beaker.

7.8 Validità del test

I risultati dei saggi sono giudicati accettabili se al termine del periodo di esposizione la sopravvivenza degli organismi di controllo è $\geq 80\%$.

Inoltre i valori dell' LC_{50} con il tossico di riferimento deve ricadere nella carta di controllo del laboratorio. Nel caso in cui queste condizioni non siano rispettate è consigliabile ripetere la prova con altri esemplari.

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.

Nei laboratori IRSA di Taranto i limiti della carta di controllo ottenuta da più operatori, in diversi anni (dal 2005 al 2018 per il saggio di tossicità acuta usando come tossico di riferimento il cadmio varia tra 0,42 - 1,55 mg L⁻¹).

7.9 Validità del test

I risultati del test di tossicità su sedimenti interi, della durata di 10 giorni, sono stati riportati come percentuale di anfipodi morti (PDA), normalizzati per controllare la risposta usando la formula di Abbott (Finney 1971).

$$Abbott = (X - Y)/(100 - Y) \cdot 100;$$

dove:

X = % di effetto nel campione testato;

Y = % di effetto nel controllo.

In tal modo si ottiene una normalizzazione delle percentuali di effetto dovute alla sostanza tossica o al campione ambientale testato rispetto al controllo negativo; Il test t ($p < 0,05$) è utilizzato per verificare le differenze statistiche tra gli effetti nei controlli e trattamenti negativi.

I valori ottenuti consentiranno di procedere al calcolo della percentuale di mortalità media (con la deviazione standard) delle 3 o 4 repliche effettuate per ogni campione. Il sedimento sarà considerato tossico se differisce significativamente dalla mortalità del controllo (t-test; $p < 0,05$).

Tabella 2. Tabella riassuntiva del test di tossicità acuta.

Parametri	Test con il tossico di riferimento Cd(NO ₃) ₂
Tipo di Test	Statico
Temperatura	16 ± 2 °C
Illuminazione	1400 lux
Fotoperiodo	24 h di luce
Ossigeno Disciolto	Aerazione costante
Salinità	36 ± 1 ‰
Acqua di diluizione	Naturale filtrata 0,45 µm
Sedimento	200 cc (2-3 cm di spessore)
N° di Repliche	3
N° di organismi per replica	20
Durata del test	10 giorni
End-point	Mortalità
Analisi dei dati	Mortalità media%; T-test

BIBLIOGRAFIA

ANNICCHIARICO C., BIANCOLINO F., CARDELLICCHIO N., DI LEO A., GIANDOMENICO S., PRATO E. (2007): "Predicting toxicity in marine sediments in Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy) using Sediment Quality Guidelines and a battery of bioassay", *Ecotoxicology*, 16, 239-246.

ASTM (1992): "Standard guide for conducting 10-d static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods". In: Annual book of ASTM standards, water and environmental technology 11.04, E1367-E92. ASTM, Philadelphia.

CARR R.S., CHAPMAN D.C. (1995): "Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests: Extraction, storage and handling techniques", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 69-77.

DE WITT T.H., SWARTZ R.C., LAMBERSON J. O. (1989): "Measuring the acute toxicity of estuarine sediments", *Environ. Toxic. Chem.*, 8, 1035-1048.

DILLON T.M., MOORE D.W., JARVIS A.S. (1994): "The effects of storage temperature and time on sediment toxicity", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 51-53.

HAMILTON M.A., RUSSO R.C., THURSTON, R.V. (1977): "Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays", *Environ. Sci. Tech.*, 11, 714-719.

ISO (2005): Water quality—Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods, 16712.

NARRACCI M., CAVALLO R.A., ACQUAVIVA M.I., PRATO E., BIANCOLINO F. (2009): "A test battery approach for ecotoxicological characterization of Mar Piccolo sediments in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy)", *Environ. Monitor. Assess.*, 148, 307-314.

PRATO E., BIANCOLINO F. (2005): "Gammarus aequicauda (Crustacea: Amphipoda): a potential species test in marine sediment toxicity assessment", *Aquat. Ecosyst. Health & Manag.*, 8 (4), 475-482.

PRATO E., DI LEO A., BIANCOLINO F., CARDELLICCHIO N. (2006): "Sediment Toxicity Tests Using Two Species of Marine Amphipods: Gammarus aequicauda and Corophium insidiosum", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76, 629-636.

PRATO E., BIANCOLINO F., SCARDICCHIO C. (2008). "Implications for toxicity tests with amphipod Gammarus aequicauda: effects of Temperature and Salinity on life cycle", *Environ. Technol.*, 29, 1349 – 1356.

PRATO E., BIANCOLINO F. (2009): "Factors Influencing the Sensitivity of Gammarus aequicauda Population from Mar Piccolo in Taranto (Southern, Italy)", *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 72(3), 770-774.

SETAC—Europe (1993): "Guidance document on sediment toxicity assessment for freshwater and marine environments". In: I. R. Hill, P. Matthiessen and F. Heinbach (Eds.), Workshop on Sediment Toxicity Assessment, Renesse, the Netherlands, 8–10 November 1993, Setac-Europe.

VOLPI GHIRARDINI A., PELLEGRINI D. (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", *Biol. Mar. Mediterr.*, 8, 1-16.



Progetto LIFE PHOENIX per la gestione dell'inquinamento idrico da PFAS in Veneto: Risultati preliminari dopo due anni di progetto

I composti perfluorurati (PFAS, acronimo di Per and Poly-Fluorinated Alkyl Substances) sono sostanze organiche formate da una catena alchilica di lunghezza variabile (in genere da 4 a 14 atomi di carbonio) parzialmente o totalmente fluorurata e da un gruppo funzionale idrofilico. Tensioattivi, termicamente stabili, idro e liporepellenti, i PFAS sono composti estremamente versatili il cui impiego spazia in svariati campi. Dalle applicazioni industriali ai prodotti di largo consumo, tra i diversi usi di questi composti si annovera il loro utilizzo nella formulazione degli insetticidi e delle schiume antincendio così come nella produzione di Teflon® e Gore-Tex®. Tanto diffusi quanto resistenti ai processi di degradazione, i PFAS sono stati ritrovati sia in matrici ambientali abiotiche sia negli organismi viventi, essere umano compreso.

In questo contesto, è di particolare interesse la situazione italiana. Uno studio condotto nel 2006 ha infatti evidenziato la presenza di elevate concentrazioni di acido perfluoro-ottanoico (PFOA) nel bacino del Fiume Po. L'allarme generato da questi risultati ha portato alla stipula di una convenzione tra il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) e IRSA per una valutazione della distribuzione dei PFAS nei principali fiumi italiani e una stima del rischio ambientale e sanitario ad essi associato. L'estesa indagine sul territorio italiano che ne è scaturita ha permesso di evidenziare alcuni hot spot molto critici. In particolare, nel 2013 è stato portato alla luce un significativo episodio di contaminazione da PFAS che ha coinvolto le acque superficiali, sotterranee e potabili di una vasta area del Veneto. La più importante fonte di inquinamento è stata riconosciuta essere un impianto fluorochimico, situato in una zona di ricarica delle acque sotterranee. Presa coscienza della situazione, la Regione Veneto ha immediatamente messo in atto opportune azioni di mitigazione. In particolare dal 2017 l'Area Sanità e Sociale della Regione del Veneto per il tramite della Direzione Prevenzione Sicurezza Alimentare, Veterinaria è coordinatore del progetto LIFE "Perfluorinated compounds HOListic ENVIRONMENTAL Interinstitutional eXperience" (LIFE-PHOENIX), condotto in associazione con IRSA, ARPAV, l'Università di Padova e Azienda Zero, che terminerà a Marzo 2021. Lo scopo generale del progetto è implementare un modello di governance di eventi da inquinamento, con particolare riferimento ai PMOC e tra questi ai PFAS a catena corta, sviluppando strumenti di gestione trasferibili anche ad altri contesti geografici caratterizzati da episodi di contaminazione simili e proponendo strategie di mitigazioni basate su tecnologie innovative. Nello specifico le attività, incentrate sul caso reale rappresentato dall'inquinamento da PFAS nelle province di Vicenza, Verona e Padova (Figura 1), prevedono:

- l'istituzione di una Commissione regionale permanente che avvalendosi di un panel di esperti garantisca un'azione tempestiva di gestione dei rischi derivanti dalla contaminazione da PFAS, attraverso l'utilizzo di strumenti innovativi di modellistica previsionale e strumenti statistico-informativi;
- la creazione di un dataware house come strumento ambientale tempestivo per la stima della distribuzione e dei rischi di determinati contaminanti, avente lo scopo di mettere in relazione su base geografica territoriale le concentrazioni misurate di un certo inchi-

News

nante con le possibili fonti di pressione a monte e con le aree di impatto a valle che potrebbero rappresentare delle vie di esposizione per l'uomo e per gli ecosistemi;

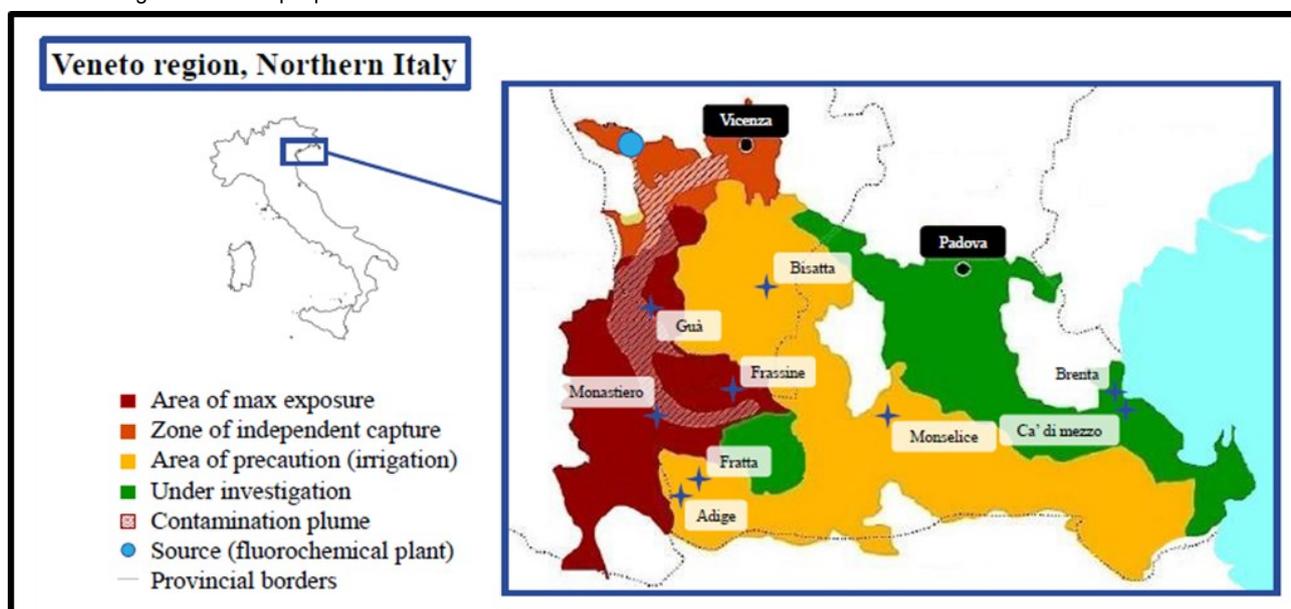
- l'incremento e la validazione dei metodi analitici di estrazione e di quantificazione di 8 acidi perfluoroalchil carbossilici da 5 a 12 atomi di carbonio e 3 acidi perfluoroalchil solfonici di 4, 6 e 8 atomi di carbonio in differenti matrici ambientali;
- il monitoraggio delle aree potenzialmente impattate attraverso il prelievo di campioni abiotici (acqua, suolo) e biotici (piante ed animali);
- il confronto tra diverse tecnologie di mitigazione e purificazione da PFAS, sia per l'acqua irrigua che potabile, mediante la realizzazione di impianti pilota;
- la validazione dei modelli di assorbimento delle piante e l'approfondimento dei meccanismi di trasporto dei contaminanti dal suolo alle colture, attraverso esperimenti di esposizione.

Risultati preliminari del progetto in corso

Il primo obiettivo raggiunto è stato il perfezionamento delle metodiche analitiche disponibili in letteratura per i PFAS. In generale, i metodi adottati per l'analisi di questi composti prevedono che la fase di estrazione dalla matrice e dell'eventuale purificazione siano seguite dalla quantificazione tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS).

Dai risultati del primo anno di campionamento è emerso che nell'acqua irrigua prelevata le concentrazioni di PFAS, espresse come somma di tutti i composti considerati, erano comprese tra 0,03 e 0,78 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mediana = 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$). I livelli registrati nel suolo erano invece inclusi tra 0,15 e 9,20 ng g^{-1} di peso secco (mediana = 0,54 ps) mentre i valori ritrovati nelle pian-

Figura 1. Siti di campionamento per la raccolta di acqua irrigua, suolo e vegetali. Le aree sono state classificate sulla base delle concentrazioni di PFAS registrate nell'acqua potabile.



News

te si collocavano nell'intervallo da 0,30 a 13,40 ng g⁻¹ di peso fresco (mediana = 2,93 ng g⁻¹ pf). La situazione descritta sembra suggerire che i vegetali non siano significativamente impattati da PFAS anche se il maggior numero di positività è stato registrato nelle piante provenienti dai siti di campionamento noti per essere quelli maggiormente inquinati, secondo la classificazione effettuata sulla base dell'esposizione dei residenti. Tuttavia, nel corso del primo anno, sono state raccolte per lo più piante non edibili, come la *Phragmites australis*, quindi la saltuaria presenza di PFAS nei vegetali analizzati non è comunque direttamente riconducibile ad un rischio per la popolazione. Attualmente sono in corso le analisi dei campioni prelevati quest'anno.

Per maggiori informazioni, consultare il sito:

<https://www.lifephoenix.eu/>

oppure contattare

Stefano Polesello polesello@irsa.cnr.it

Durante il primo anno sono stati inoltre approfonditi i meccanismi di assorbimento delle piante mediante due studi condotti rispettivamente sulla cosiddetta lenticchia d'acqua e sul radicchio. I risultati ottenuti hanno portato alla pubblicazione degli articoli "Evaluation of morphophysiological traits and contaminant accumulation ability in *Lemna minor* L. treated with increasing perfluorooctanoic acid (PFOA) concentrations under laboratory conditions" (Pietrini et al., 2019) e "Uptake and translocation of perfluoroalkyl acids (PFAA) in red chicory (*Cichorium intybus* L.) under various treatments with pre-contaminated soil and irrigation water" (Gredelj et al., 2019) sulla rivista scientifica Science of the Total Environment. .

a cura di
Claudia Ferrario



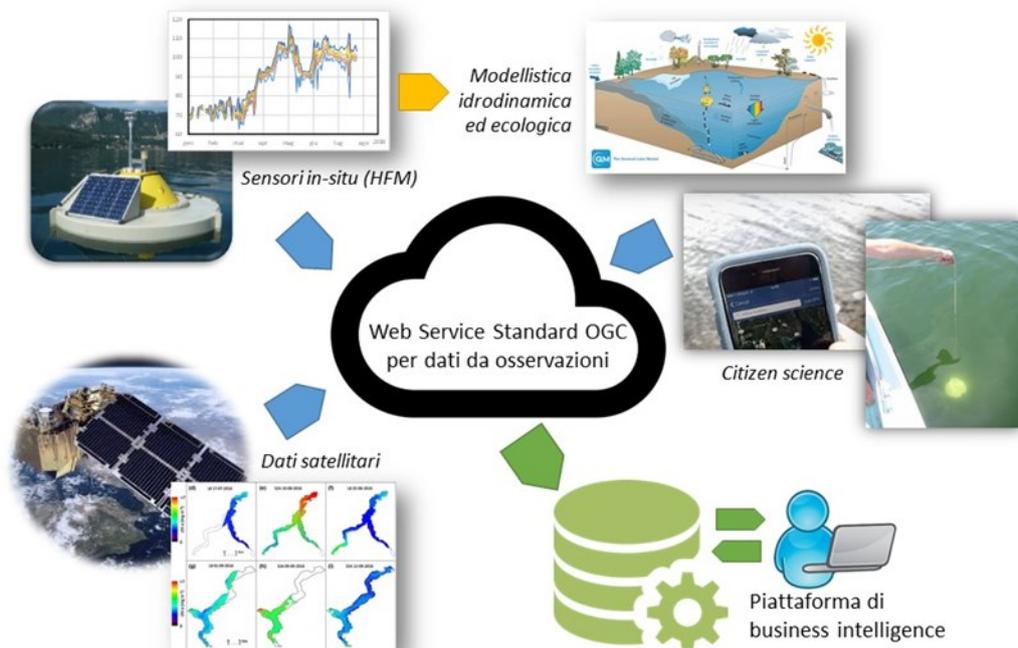
Il Progetto SIMILE: Tecnologia e innovazione per il monitoraggio dei laghi

Il progetto SIMILE (Sistema Informativo per il Monitoraggio Integrato dei Laghi insubrici e dei loro Ecosistemi) finanziato nell'ambito del Programma di Cooperazione INTERREG Italia-Svizzera 2014-2020 (Asse 5: Rafforzamento della governance transfrontaliera), si pone l'obiettivo di rafforzare la gestione coordinata delle acque dei laghi dell'area insubrica e di accrescere la partecipazione degli stakeholder ai processi di conoscenza e di gestione della risorsa idrica.

Il progetto SIMILE ha come oggetto i laghi dell'area insubrica: Lugano, Maggiore e Como. L'obiettivo principale del progetto è quello di supportare le presa di decisioni e la definizione di politiche di gestione tramite un sistema informativo avanzato basato su dati provenienti da sistemi di monitoraggio innovativi (automatici, diversificati, a costi contenuti e ad alta risoluzione spaziale e temporale). In particolare, si vogliono introdurre nuove metodologie di acquisizione delle informazioni sullo stato della risorsa, integrando i dati esistenti con misure automatiche provenienti da sensori in situ, con i nuovi dati liberi del progetto europeo Copernicus e con le informazioni fornite dai cittadini ("citizen science").

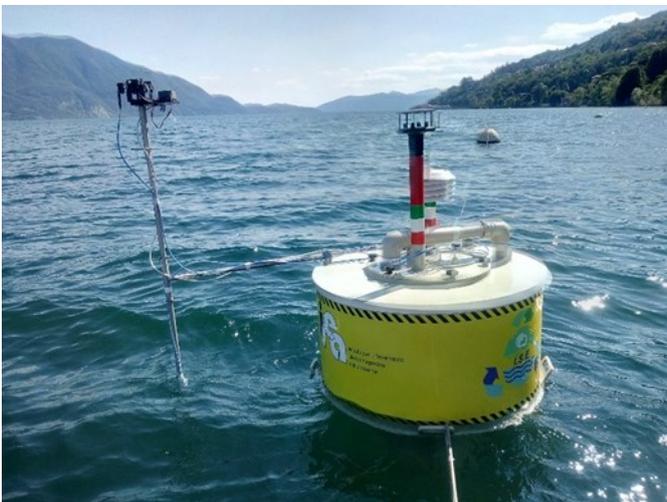
Il progetto intende anche individuare le modalità con le quali integrare e condividere queste informazioni con tutti gli enti interessati, sia in Italia che in Svizzera, in tempo reale usando standard internazionali, rafforzando la capacità d'analisi dei dati al fine di aumentare la comprensione e la presa di decisioni tempestive per mitigare eventuali criticità.

Grazie alla capitalizzazione delle esperienze dei partner di progetto, attivi da anni nel campo del monitoraggio e della gestione della risorsa idrica, anche nell'ambito dei programmi CIP AIS (Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere) e a questi sistemi innovativi, sarà possibile passare da un paradigma di gestione "ad obiettivi fissi" ad



News

uno “adattivo”. Inoltre il progetto, tramite un processo partecipato (partner, cittadini, associazioni, enti), prevede la produzione di linee guida su quali siano e come vadano affrontate le sfide future che i grandi laghi subalpini sono chiamati ad affrontare. Tale sistema, aperto (sia componenti software che hardware), sarà progettato in modo da offrire una soluzione efficace, a basso costo e sostenibile che potrà quindi essere mantenuta dai partner del progetto oltre la durata dello stesso.



Il progetto, della durata di 36 mesi, vede come capofila Politecnico di Milano (Polo di Lecco) e Scuola Universitaria Professionale della Svizzera Italiana (SUPSI) e come partner CNR IRSA, Regione Lombardia DG Ambiente e Clima e Canton Ticino. Collaborano inoltre al progetto il CNR IREA di Milano e l'Università di Pavia.

Il CNR IRSA sarà impegnato in particolare nei WP di progetto che riguardano: (i) la progettazione del sistema di monitoraggio integrato dei laghi sulla base di un'analisi della situazione attuale e dei fabbisogni del territorio; (ii) l'installazione di sensori in-situ su boe/piattaforme per il monitoraggio ad alta frequenza (HFM) di parametri limnologici, e (iii) l'applicazione di modellistica idrodinamica ed ecologia ai laghi a scopo previsionale. L'HFM si propone ormai da diversi anni come un'utile integrazione al monito-

raggio discreto dei laghi, ovvero basato su campionamenti ed analisi a frequenza mensile o inferiore. I dati discreti consentono infatti la caratterizzazione dello stato ecologico e chimico ai sensi di legge, ma non sono sufficienti per cogliere tutte le dinamiche fisiche, chimiche e biologiche che interessano le acque lacustri, soprattutto nei periodi dove la variabilità di alcuni processi può essere maggiore (es. mesi estivi per i bloom algali) e può essere necessario un early warning ad es. per le acque di balneazione. Per poter descrivere questi fenomeni, e soprattutto per coglierne possibili effetti, anche se a breve termine, sui corpi idrici è necessario disporre di dati ad alta frequenza, possibilmente trasmessi in tempo reale. Questa tipologia di dati non può essere sostitutiva rispetto a quelli derivanti da un monitoraggio standard e completo, che prevede l'analisi di numerosi parametri chimi-

ci e biologici; può però rappresentare un'utile integrazione ai campionamenti discreti, soprattutto nell'ottica di individuare precocemente alcuni processi e fenomeni e predisporre i dovuti approfondimenti e interventi.

Per informazioni:

<http://www.interreg-italiasvizzera.eu/progetti/simile/>

Nel progetto SIMILE verranno sperimentate e validate alcune tecnologie di HFM, con l'obiettivo di valutarne l'utilità ai fini della valutazione dello stato delle acque e nel complesso di migliorare la capacità di valutazione dello stato della risorsa idrica lacustre.

A cura di:

Michela Rogora, Andrea Lami, Dario Manca
CNR/IRSA, Sede di Verbania



Campagna di Citizen Science

SOS Pinna: la Subacquea aiuta la Ricerca

Pinna nobilis L. è un mollusco bivalve filtratore, endemico del Mediterraneo. Può raggiungere oltre 1 metro di lunghezza e vivere fino a oltre 30 anni. È considerata una specie iconica in quanto ampiamente distribuita lungo tutte le coste del nostro mare e presente da sempre nelle tradizioni storiche, culturali, sociali oltre che economiche delle popolazioni rivierasche.

Vive su fondi molli, sabbiosi e fangosi, da 0,5 a oltre 50 metri di profondità, con la conchiglia infissa e saldamente ancorata al sedimento grazie ai filamenti di bisso prodotti da un'apposita ghiandola e che hanno un forte potere adesivo. Il bisso è uno dei motivi che hanno reso questo mollusco prezioso. Dalle sue fibre, trattate in modo da poter essere tessute, veniva ricavato un filato con caratteristiche pregiate, usato per produrre quella che veniva chiamata "la seta del mare".

La "pinna nobile" è stata da sempre oggetto di raccolta per vari motivi ed era anche fonte di guadagno; a Taranto negli anni '30 ne venivano pescate circa 10.000 all'anno e rappresentavano una fonte di benessere per i pescatori locali. Oltre che ricavarne il bisso, ne venivano consumate le carni e la conchiglia era usata per produrre la madreperla.

Negli ultimi 30 anni, l'eccessivo sfruttamento di questa risorsa, oltre che la distruzione delle conchiglie causata dalla pesca a strascico e dagli ancoraggi e la regressione delle praterie di Posidonia, l'habitat preferito dal mollusco, ha portato ad una drastica riduzione delle popolazioni. Per questo motivo la specie è stata inserita tra quelle in pericolo di estinzione ed attualmente è protetta da convenzioni internazionali recepite dalle leggi di ciascun Paese del Mediterraneo, Italia compresa. Questo stringente regime di protezione si è rivelato molto efficace tanto che in tutto il Mediterraneo le popolazioni di nacchere di mare, come è comunemente conosciuta la *Pinna nobilis*, avevano densamente ripopolato i litorali.

Da alcuni anni, però, un altro fenomeno sta seriamente minacciando la sopravvivenza della specie.

Nell'autunno del 2016 è stato registrato un fenomeno di moria di massa lungo le coste spagnole del Mediterraneo, che progressivamente si è esteso verso est, arrivando ad interessare le coste tirreniche italiane e poi quelle ioniche. Attualmente queste morie massive sono state osservate anche nell'Egeo e nel basso Adriatico, mentre l'Adriatico settentrionale sembra per ora immune.

L'analisi istologica degli individui morti ha individuato cellule mononucleate, binucleate e plasmodiali multinucleate specialmente nelle ghiandole digestive, associate a fenomeni degenerativi dei tessuti. Le successive analisi molecolari hanno portato alla descrizione di una nuova specie di protozoo parassita, denominato *Haplosporidium pinnae*. Di questo organismo si sa che i suoi stadi infettivi vengono ingeriti con la filtrazione, ma non si conosce ancora il ciclo vitale e quindi neanche le modalità di infezione. Sicuramente causa la morte degli individui per inedia e che la mortalità di massa, nelle zone colpite, è arrivata anche al 100%.

Questo fenomeno ha chiaramente suscitato l'interesse del mondo della ricerca scientifica. In molti paesi, la Spagna in primis, c'è stata una mobilitazione per cercare soluzioni al problema che in breve tempo potreb-

News

be portare all'estinzione della specie. In Italia per il momento, sotto l'egida del Ministero Ambiente, viene svolto solo un monitoraggio nell'ambito della Marine Strategy che però, a causa delle metodiche previste, non è sufficiente neanche a valutare il fenomeno, tantomeno a proporre soluzioni. Altre attività sono svolte da locali gruppi di ricerca, però abbastanza slegati fra loro.



La scorsa estate, il gruppo subacqueo della Sede di Taranto dell'IRSA ha condotto un'attenta valutazione della moria di massa occorsa nel Mar Piccolo e nel Mar Grande, dove era presente una popolazione di oltre 10.000 individui. In collaborazione con l'Università di Teramo sono state condotte analisi citologiche, istologiche e molecolari che hanno confermato l'infezione da *Haplosporidium pinnae*. La vasta portata del fenomeno ci ha spinto allora a organizzare una campagna di Citizen Science che abbiamo chiamato "SOS Pinna: la Subacquea aiuta la Ricerca".

L'idea di fondo è stata ampliare al massimo la possibilità di ritrovare individui sopravvissuti grazie all'aiuto di centinaia di professionisti e appassionati che quotidianamente si immergono in zone che i pochi ricercatori subacquei non potrebbero investigare in maniera capillare. Nel giugno 2019 si è svolto presso il Castello Aragonese di Taranto il meeting di presentazione della campagna, cui hanno partecipato i gruppi subacquei delle Forze Armate e dei Vigili del Fuoco, insieme a tutte le Associazioni di subacquei amatoriali e i Diving che operano nel territorio. È stata presentata la problematica e chiesta la collaborazione per l'individuazione e il monitoraggio degli individui ritrovati vivi durante le attività istituzionali e ricreative dei vari gruppi. Le prime segnalazioni pervenute hanno permesso di georeferenziare un pur piccolo numero di pinne so-

In alto: due esemplari di *Pinna nobilis* in buona salute nel Mar Grande di Taranto nell'estate del 2017;

In basso: visione emblematica della moria di massa che ha colpito le pinne nobili nei mari di Taranto (Mar Piccolo, agosto 2019).
(foto Gianni Squitieri)



News

pravvissute tra il Mar Grande e il Mar Piccolo di Taranto, dispersi tra le migliaia di individui morti.

Tale attività di Citizen Science è stata estesa su tutto il territorio nazionale, interessando i Comandi Generali della Guardia di Finanza, della Marina Militare e della Guardia Costiera, che con i loro nuclei subacquei operano costantemente lungo le coste della penisola e che hanno aderito con entusiasmo all'iniziativa. In questo ambito, la collaborazione con la Direzione Marittima di Pescara della Guardia Costiera e con la Scuola Sub Loto di Pescara, ci ha permesso di effettuare una prima attività di monitoraggio presso l'Area Marina Protetta delle Isole Tremiti, in collaborazione con la Direzione del Parco del Gargano. Dopo il briefing svoltosi presso la Capitaneria di Porto di Termoli il 9 settembre, il giorno successivo ci si è spostati alle isole dove, purtroppo, abbiamo osservato una estesa moria con oltre il 90% degli individui colpiti in zone dove fino al precedente luglio, la situazione, come segnalato dai ricercatori dell'Università di Bari, sembrava normale.

Attualmente la Campagna SOS Pinna, grazie alla collaborazione con l'Università di Teramo, è stata estesa all'Abruzzo, dove le popolazioni di *Pinna nobilis*, pur non molto abbondanti, sono in buona salute. Anche in quella regione il mondo della subacquea ha risposto con entusiasmo, tanto che siamo stati invitati insieme all'Università di Teramo, alla Direzione Marittima della Guardia Costiera di Pescara e alla Scuola Sub Loto, a presentare la nostra attività per la salvaguardia della nacchera di mare nell'ambito delle "Domeniche a Torre del Cerrano", organizzate dall'Area Marina Protetta in provincia di Teramo. Parteciperemo anche alla cerimonia conclusiva del concorso fotosub "See in the Sea International Underwater Contest" organizzato da OrtonaSub che, con la partecipazione di centinaia di fotografi subacquei, ci permetterà di diffondere il messaggio alla base di SOS Pinna in tutto il mondo della subacquea mediterranea.

Fernando Rubino, Giovanni Fanelli

Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, Taranto



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, via Salaria km 29+300.

C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

Telefono: 06 90672 850

Fax: 06 90672 787

e-mail: notiziario@irsa.cnr.it

Direttore responsabile

Giuseppe Mascolo

Comitato di Redazione

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

Segreteria di Redazione

S. Ghergo



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