



UNIVERSITÀ' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Scienze e Tecnologie

Corso di Laurea Magistrale in Biodiversità ed evoluzione biologica

**VALUTAZIONE DELLA SALUBRITA' AMBIENTALE NEL
DISTRETTO DELLA VALLE DELL'OLONA TRAMITE
APPROCCIO ECOTOSSICOLOGICO**

RELATORE

Dott.ssa Camilla Della Torre

CORRELATORE

Dott. Simone Maiorana

TESI DI LAUREA DI

Simone Demicheli

Matricola 933741

Anno accademico: 2023/2024

Tesi svolta presso:

Dipartimento di Ricerca Ambiente e Salute

IRCCS-Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”

INDICE

1. INTRODUZIONE4
 - 1.1. Il monitoraggio ambientale e la sua importanza4
 - 1.1.1. Monitoraggio dell'ambiente atmosferico6
 - 1.1.2. Monitoraggio dell'ambiente idrico8
 - 1.1.3. Monitoraggio dell'ambiente del suolo12
 - 1.2. I rischi legati al rilascio di composti inquinanti nell'ambiente14
 - 1.2.1. La salute umana14
 - 1.3. L'ecotossicologia16
 - 1.3.1. Introduzione all'ecotossicologia16
 - 1.3.2. Gli organismi modello18
 - 1.3.3. Tossicologia acqua, suolo e aria20
 - 1.3.4. Tossicità cronica, subcronica e acuta31
2. SCOPO DEL LAVORO34
3. MATERIALI E METODI36
 - 3.1. Area di studio36
 - 3.2. Campioni di suolo e di acqua superficiale37
 - 3.3. Organismi usati nei saggi42
 - 3.4. SAGGI DI TOSSICITÀ TERRESTRE43
 - 3.4.1. Saggio di fitotossicità sul sorgo e sul crescione44
 - 3.4.2. Saggio di tossicità su *E. andrei*46
 - 3.5. SAGGI DI TOSSICITÀ ACQUATICA48
 - 3.5.1. Saggio di immobilizzazione acuta su *Daphnia magna*48
 - 3.5.2. Saggio di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata*51
 - 3.5.3. Saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri*56
4. RISULTATI60
 - 4.1. Introduzione ai risultati60
 - 4.2. Risultati saggi tossicità terrestre61
 - 4.3. Risultati saggi tossicità acquatica70
5. CONCLUSIONI76
6. BIBLIOGRAFIA77

1. INTRODUZIONE

La crescente attenzione verso i temi ambientali non è altro che una delle conseguenze della profonda crisi che sta attraversando il rapporto uomo-ambiente.

La gravità di questa emergenza è tale da minacciare direttamente la vita sul nostro pianeta e dunque è importante agire per garantire un futuro per le generazioni presenti e future.

Con “*inquinamento ambientale*” si intende l’immissione dovuta direttamente o indirettamente all’uomo, di energia o di sostanze nell’aria, dove le conseguenze sono tali da mettere a rischio la salute dell’uomo, le risorse naturali ed il sistema ecologico. Negli ultimi anni si è evidenziato un crescente interesse verso la valutazione del rischio associata all’utilizzo delle sostanze chimiche da parte dell’uomo rilasciate nell’ambiente.

Tra le varie tipologie di inquinanti, il cui numero risulta essere molto elevato e complesso, quelli a maggior impatto ambientale risultano essere l’ozono, il biossido di azoto, polveri totali sospese, metalli pesanti, diossine e furani, PCB e idrocarburi policiclici aromatici (IPA), farmaci e sostanze illecite.

1.1. Il monitoraggio ambientale e la sua importanza

Il monitoraggio ambientale viene definito dall’Agenzia Europea dell’Ambiente (EEA) come “*la misurazione, valutazione e determinazione dei parametri ambientali e/o di livelli di inquinamento, periodiche e/o continuate allo scopo di prevenire effetti negativi e dannosi verso l’ambiente*”.¹ Il monitoraggio è ad oggi uno strumento fondamentale per la prevenzione di problematiche derivanti dall’inquinamento ambientale; lo ritroviamo infatti in tutti gli ambiti di indagine in merito ad attività naturali e antropiche. Secondo l’ISPRA, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale: “Le principali emissioni in termini di scarichi puntuali e diffusi,

1 Caspersen, O. (1999). “The European Environment Agency”. *Global Environmental Change*,9(1),71-75.

sversamenti, perdite che determinano l'alterazione dello stato di qualità delle risorse idriche e gli impatti subiti dagli ecosistemi, sono prodotte dai settori agro-zootecnico, industriale, civile e turistico. I principali inquinanti derivati dagli insediamenti civili sono le sostanze organiche biodegradabili; il settore agro-zootecnico produce inquinamento da nutrienti, fertilizzanti e fitosanitari, mentre l'industria genera quello da sostanze organiche alogenate e da metalli pesanti. Le informazioni relative all'origine e alla distribuzione temporale e territoriale di questi inquinamenti derivano soprattutto dalle attività di monitoraggio e controllo". Il lungo elenco di attività antropiche che vengono monitorate comprende ovviamente anche le discariche.²

Per una corretta impostazione di un monitoraggio ambientale, è necessario tenere in considerazione una moltitudine di fattori. In primo luogo, risulta essere necessario identificare le sostanze altamente rilevanti, poiché esistono migliaia di potenziali inquinanti e, pertanto, sarebbe inutile la loro ricerca in un ambiente specifico senza conoscere le loro modalità d'impiego, le quantità delle loro emissioni e come vengono dispersi nell'ambiente. Queste informazioni risultano essere cruciali al fine di comprendere quanto una sostanza possa essere dannosa per l'ambiente.

Un altro punto fondamentale è sapere quanto una sostanza sia in grado di muoversi e persistere nell'ambiente. Questo permette di evitare lo spreco di risorse nella ricerca, poiché tali sostanze potrebbero essere di difficile individuazione e rilevazione. Un altro importante fattore risulta essere quello di localizzare un particolare inquinante, poiché monitorare un intero ambiente risulta essere eccessivamente dispersivo, inutile e costoso. Inoltre, ricevere dati da un unico comparto potrebbe portare a conclusioni errate, in quanto una sostanza è in grado di spostarsi dall'ambiente in cui è stata introdotta. Ad esempio, la ricerca di una sostanza volatile in acqua, potrebbe non portare a conclusioni, poiché non ne rileviamo la presenza, ma appunto per questa sua alta volatilità, la sostanza risulta ancora essere un problema, in quanto può non essere presente in acqua, ma può essersi spostata nell'aria.

Di fondamentale importanza è anche la comprensione dei dati di concentrazione di un contaminante, in quanto la loro unica misurazione, non pregiudica i processi che li hanno determinati. La non conoscenza della distribuzione e la permanenza nel tempo

² ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale)
<http://www.isprambiente.gov.it>

della sostanza nell'ambiente, non permette la previsione di come potrà diffondersi o trasferirsi, pertanto è possibile effettuare campionamenti e misurazioni estremamente frequenti e dettagliati, che però risultano essere pratiche poco sostenibili.

Per condurre un monitoraggio in maniera efficace, risulta essere necessario seguire diversi approcci, che partono dall'organizzazione di uno schema statistico di campionamento, seguito da una selezione dei metodi di prelievo, trasporto e conservazione dei campioni fino alle analisi in laboratorio. I campioni ambientali possono essere prelevati in “modo attivo”, ad esempio utilizzando campionatori ad alto volume, che catturano in apposite cartucce, i contaminanti presenti nell'aria, oppure prelevando direttamente campioni di acqua o suolo con appositi strumenti. Di recente, sono state sviluppate anche tecniche che utilizzano campionatori passivi, come la schiuma di poliuretano (PUF) per il campionamento dell'aria. Analizzando le concentrazioni nel campionatore passivo e comprendendo come avviene l'accumulo nei materiali utilizzati, è possibile ottenere una stima delle concentrazioni medie nel periodo di esposizione.

La conoscenza e il controllo dei livelli di inquinamento di aria, acqua e suolo, consente di individuare in maniera rapida e tempestiva eventuali criticità, cause perturbatrici o potenzialmente dannose e, di conseguenza, adottare misure preventive o correttive, proteggendo in tal modo ciascuna matrice ambientale.

Con “matrice ambientale” viene intesa in maniera molto semplice, una delle unità fisiche in cui può essere “scomposto” l'ambiente che ci circonda e con cui interagiamo, quindi l'aria, le acque, il suolo, la vegetazione, ma anche fattori fisici come il rumore, le vibrazioni o i campi elettromagnetici.³

1.1.1. Monitoraggio dell'ambiente atmosferico

L'inquinamento dell'aria è dato dalla contaminazione dell'ambiente indoor ed outdoor da parte di agenti chimici, fisici o biologici che modificano le caratteristiche naturali dell'atmosfera, diventando in questo modo pericolosi sia per la salute umana che per

3 ISPRA, Monitoraggio Ambientale

Sviluppo ed implementazione del processo di Sviluppo ed implementazione del processo di Valutazione di Impatto Ambientale Valutazione di Impatto Ambientale

1 dicembre 2004 (<https://www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00000600/621-tv-monitoraggio.pdf>)

quella ambientale. Apparecchi per il riscaldamento delle abitazioni, i motori dei veicoli, gli impianti industriali e gli incendi boschivi sono comuni sorgenti di inquinamento atmosferico. Le aziende e le organizzazioni sono quindi soggette al rispetto di norme governative nazionali per il mantenimento della qualità dell'aria. In Italia le emissioni di molti inquinanti atmosferici sono diminuite notevolmente negli ultimi decenni, con conseguente miglioramento della qualità dell'aria; tuttavia, le concentrazioni di inquinanti atmosferici sono ancora troppo elevate e i problemi di qualità dell'aria persistono. Inquinanti di grande interesse per la salute pubblica sono il materiale particolato (PM₁₀ e 2,5), il monossido di carbonio (CO), l'ozono (O₃), il biossido di azoto (NO₂) e quello di zolfo (SO₂). Possono essere monitorati o in tempo reale, mediante dei software, i quali sensori monitorano e segnalano le quantità degli inquinanti oppure manualmente con stazioni fisse. La stima delle emissioni e la loro concentrazione risulta necessaria al fine di valutare la qualità dell'aria, per poter studiare i fenomeni e pianificare misure e azioni correttive, per il risanamento della qualità dell'aria.⁴

Gli inquinanti gassosi e le particelle solide e liquide, emessi direttamente da varie sorgenti antropiche e naturali, sono detti "primari". A partire da questi, detti anche "precursori", attraverso una serie di reazioni chimiche, possono formarsi in atmosfera altri inquinanti gassosi (es. Biossido di Azoto) e nuove particelle, le quali vengono definite inquinanti "secondari".⁵

Il campionamento passivo dell'aria, o campionamento dell'aria "diffusivo", si basa su fattori legati al clima come il vento per spostare gli inquinanti dall'atmosfera terrestre a un mezzo solvente. I campionatori passivi, che includono tubi di diffusione, sono piccoli, silenziosi e facili da usare, il che li rende particolarmente utili nelle indagini sulla qualità dell'aria di aree importanti da monitorare mediante monitoraggio continuo. L'inquinamento atmosferico può essere studiato anche attraverso il "biomonitoraggio", che impiega organismi che accumulano inquinanti atmosferici, inclusi muschi, alghe, licheni, funghi e altri tipi di biomassa. Uno dei vantaggi di questo metodo di campionamento è la capacità di raccogliere dati che possono essere quantificati tramite valutazioni di molecole che riflettono l'ambiente fisico da cui provengono.

4 ISPRA, Aria (<https://www.isprambiente.gov.it/it/attivita/aria-1>)

5 ISPRA, Qualità dell'aria (<https://www.isprambiente.gov.it/it/attivita/aria-1/qualita-dellaria>)

Tuttavia, è necessario prestare attenzione nella scelta dell'organismo preciso, del modo in cui si diffonde e della sua relazione con l'inquinante.⁶

La valutazione dello stato della qualità dell'aria ambiente è regolata dalle direttive europee 2008/50/CE, 2004/107/CE e a livello italiano con altre due direttive, il D.lgs 155/2010 e s.m.i.⁷

1.1.2. Monitoraggio dell'ambiente idrico

Le attività di monitoraggio dei corpi idrici sono fondamentali, per una sicurezza igienico sanitaria, per la salute umana ed ambientale. Tale attività rappresenta uno strumento efficace per la conoscenza dello stato ambientale acquatico e un valido supporto per la pianificazione territoriale ai fini del suo risanamento.⁸

La valutazione dello stato della qualità dell'acqua è regolata dalle direttive europee 91/676/CEE (direttiva relativa alla protezione delle acque dell'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole), 91/271/CEE (direttiva sul trattamento delle acque reflue urbane) e a livello italiano che recepisce le altre due direttive, il D.lgs 152/1999⁹ modificato dal D.lgs 258/2000¹⁰ e s.m.i.

Lo stato di qualità ambientale dei corpi idrici superficiali è definito sulla base dello stato ecologico e dello stato chimico del corpo idrico.

- **Stato ecologico** dei corpi idrici superficiali è l'espressione della complessità degli ecosistemi acquatici, e della natura fisica e chimica delle acque e dei sedimenti, delle caratteristiche del flusso idrico e della struttura fisica del

6 Emily Greenfield, 2023 (<https://sigmaearth.com/it/environmental-monitoring-a-complete-guide/>)

7 D.lgs 155/2010 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2010-08-13:155>)

8 ARPA FVG (<https://www.arpa.fvg.it/temi/temi/acqua/ultimi-pubblicati/criteri-per-la-definizione-del-monitoraggio-dei-corpi-idrici-sotterranei/>)

9 D.lgs 152/1999 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11:152>)

10 D.lgs 258/2000 18/08/2000

<https://www.normattiva.it/urires/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2000:258>

corpo idrico, considerando comunque prioritario lo stato degli elementi biotici dell'ecosistema.

- **Stato chimico** è definito in base alla presenza di microinquinanti ovvero di sostanze chimiche pericolose. La valutazione dello stato chimico dei corpi idrici superficiali è effettuata inizialmente in base ai valori soglia riportate nella direttiva 76/464/CEE e nelle direttive da essa derivate.
- Lo **stato ambientale** è definito in relazione al grado di scostamento rispetto alle condizioni di un corpo idrico di riferimento.

L'organizzazione del monitoraggio si articola su una fase conoscitiva e una fase a regime.

La “*fase conoscitiva iniziale*”: ha una durata di 24 mesi ed ha come finalità la classificazione dello stato di qualità dell'acqua di ciascun corpo idrico. Essa ha lo scopo di raccogliere tutte le informazioni utili alla valutazione di tutti gli elementi biologici e idromorfologici necessari per la definizione dello stato ecologico dei corpi idrici superficiali.

La “*fase a regime*” viene effettuato un monitoraggio volto a verificare il raggiungimento o il mantenimento dell'obiettivo di qualità “buono” o “elevato”.¹¹

In base al D. lgs. 152/99, ai fini della prima classificazione della qualità dei corsi d'acqua, vanno eseguite determinazioni sulla matrice acquosa e sul biota, qualora ne ricorra la necessità, tali determinazioni possono essere integrate da indagini sui sedimenti e da saggi di tossicità. La determinazione sulla matrice acquosa riguarda due gruppi di parametri: quelli di base (tabella 1.1) che riflettono le pressioni antropiche e le caratteristiche idrologiche del trasporto solido (sono obbligatori) e quelli addizionali (tabella 1.2) relativi ai microinquinanti organici ed inorganici:

¹¹ D.lgs 11 maggio 1999, n. 152 allegato 1 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11:152>)

Portata (m3/s)	Ossigeno disciolto (mg/L) **
pH	BOD5 (O2 mg/L) **
Solidi sospesi (mg/L)	COD (O2 mg/L) **
Temperatura (°C)	Ortofosfato (P mg/L) *
Conducibilità (m S/ cm (20°C)) **	Fosforo Totale (P mg/L) **
Durezza (mg/L di CaCO3)	Cloruri (Cl- mg/L) *
Azoto totale (N mg/L) **	Solfati (SO4 -- mg/L)*
Azoto ammoniacale (N mg/L)	Escherichia coli (UFC/100 mL)
Azoto nitrico (N mg/L) *	
(*) determinazione sulla fase disciolta (**) determinazione sul campione tal quale	

Figura 1- Parametri base (ottenuta da D. lgs. 152/99¹²)

INORGANICI (disciolti)	ORGANICI (sul tal quale)
Cadmio	aldrin
Cromo totale	dieldrin
Mercurio	endrin
Nichel	isodrin
Piombo	DDT
Rame	esaclorobenzene
Zinco	esaclorocicloesano
	esaclorobutadiene
	1,2 dicloroetano
	tricloroetilene
	triclorobenzene
	cloroformio
	tetracloruro di carbonio
	percloroetilene
	pentaclorofenolo

Figura 2- Principali inquinanti chimici da controllare nelle acque dolci superficiali (ottenuta da D. lgs. 152/99¹³)

12 D. lgs. 152/99 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11:152>)

13 D. lgs. 152/99 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11:152>)

Il monitoraggio della qualità dei corsi d'acqua viene comunemente effettuato con l'uso di indicatori, prevalentemente di carattere chimico e fisico come la quantità di ossigeno e la temperatura. Solo da alcuni anni sono diventati di uso comune metodi biologici che consentono una valutazione della qualità non solo dell'acqua ma dell'ambiente acquatico nel suo complesso.¹⁴

Questo metodo di monitoraggio implica la valutazione dell'Indice Biotico Esteso (I.B.E.), che è un indicatore in grado di valutare la qualità complessiva di un tratto di corso d'acqua considerando nel tempo gli impatti di vari fattori di alterazione ambientale (sia fisici, chimici che biologici). L'I.B.E. si distingue per la sua capacità di integrare diversi segnali, offrendo così una valutazione più completa.¹⁵

L'Indice Biotico Esteso utilizza la comunità biologica dei macroinvertebrati, ossia quell'insieme di organismi che, alla fine dello sviluppo larvale possiedono raramente dimensioni inferiori al millimetro risultando, quindi, visibili ad occhio nudo. Essi comprendono larve e adulti di insetti, molluschi, crostacei, tricladi, oligocheti ed irudinei.

Oltre all'Indice Biotico Esteso (I.B.E.), è di grande importanza eseguire diversi saggi ecotossicologici su un corpo idrico. Questi saggi permettono di valutare l'impatto di sostanze tossiche presenti nell'acqua e di comprendere meglio la salute complessiva dell'ecosistema acquatico.

- saggio di immobilizzazione acuta su *Daphnia magna*
- saggio di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata*
- saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri*

Il D.lgs 152/99 definisce un numero minimo di stazioni di prelievo ed una frequenza minima di campionamento ed analisi per i differenti parametri in funzione della tipologia del corso d'acqua, della superficie del bacino e del raggiungimento

14 ISPRA, Linee guida per il monitoraggio (https://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/MLG_143_16.pdf)

15 ISPRA, Indicatori biologici (<https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/IBE.pdf>)

dell'obiettivo di qualità. Il numero delle stazioni può essere aumentato in presenza di particolari valori naturalistici del corpo idrico¹⁶.

1.1.3. Monitoraggio dell'ambiente del suolo

Il suolo è la porzione superficiale che ricopre la maggior parte dei terreni. È costituito da particelle inorganiche e da materia organica.¹⁷

Il monitoraggio del suolo è importante al fine di prevenirne la degradazione, la contaminazione e la perdita di fertilità. Esso comporta la raccolta e analisi di campioni di terreno, al fine di valutarne la qualità, le componenti e lo stato fisico¹⁸.

La natura prevalentemente non uniforme dei terreni rende difficile estendere le caratteristiche chimiche e fisiche di un singolo campione ad una porzione estesa di matrice di provenienza. Al contrario, ogni campione è rappresentativo esclusivamente di una porzione di terreno nell'intorno del punto di prelievo le cui dimensioni dipendono da molteplici fattori quali:

- dimensione dei granuli di terreno e la loro natura,
- le discontinuità degli strati laterali e verticali,
- l'omogeneità della matrice,
- il grado di saturazione,
- la natura e concentrazione di eventuali contaminanti,

16 ISPRA, Qualità dei corsi d'acqua (<https://www.isprambiente.gov.it/files/acqua/qualita-dei-corsi-acqua.pdf>)

17 Advances in Agricultural and Horticultural Sciences Chapter - 73 Megha Dubey, Nidhi Verma, editor Dr. Yuvraj A. Shinde; autori Dr. Yuvraj A. Shinde (https://www.researchgate.net/profile/TejpalDahiya/publication/358899022_Biofloc_Technology_An_emerging_and_innovative_approach_for_sustainable_aquaculture_productivity/links/6253ec66ef0134206669a186/Biofloc-Technology-An-emerging-and-innovative-approach-for-sustainable-aquaculture-productivity.pdf#page=705)

18 EEA, Soil monitoring in Europe — Indicators and thresholds for soil health assessments 18 Jan 2023 (<https://www.eea.europa.eu/publications/soil-monitoring-in-europe>)

- le discontinuità dovute a presenza di elementi estranei al terreno, sia naturali (resti vegetali, apparati radicali attivi) sia antropici (interramenti di materiali di scarto o rifiuti, linee di servizio), ecc.

Pertanto, l'efficacia di un campionamento dipende strettamente dalla quantità di campioni prelevati, ovvero maggiore è il numero dei campioni, maggiore è la sua rappresentatività.

I campioni di terreno si distinguono in due tipologie: campioni puntuali o campioni compositi¹⁹.

- I ***campioni puntuali*** (o istantaneo), è costituito da singoli prelievi, realizzati in un momento e in un luogo specifico. Ogni aliquota di terreno rappresenta un campione²⁰.
- I ***campioni compositi*** sono costituiti da due o più aliquote di terreno, provenienti da punti diversi prelevati nello stesso luogo, in diversi momenti, oppure più aliquote di terreno provenienti da numerosi siti contemporaneamente, che vengono miscelate (omogeneizzate) a formare un unico campione.²¹

Il campionamento del suolo può avvenire a livello superficiale o in profondità del terreno, con metodi di raccolta differenti a seconda dello strato raccolto (Emily Greenfield, 2023).

Nel caso di ***campioni da prelevare in superficie***, si ricorre alla raccolta del terreno mediante spatola o paletta meccanica, ma possono essere utilizzati anche strumenti come carotieri, campionatori a tubo pieno, etc. Il campionamento superficiale si attua soprattutto quando si cercano sostanze poco miscibili in acqua (es. diossine e PCB), che, se rilasciate sulla superficie del suolo, hanno scarsa tendenza a penetrarvi come soluzione acquosa.

19 Synthesis s.r.l. (<https://www.synthesisr.com/matrice-terreno.html>)

20 Gazzetta ufficiale, Articolo 4; Tipi di campionamento

<https://www.gazzettaufficiale.it/atto/regioni/caricaArticolo?art.progressivo=0&art.idArticolo=4&art.versionsione=1&art.codiceRedazionale=090R0276&art.dataPubblicazioneGazzetta=1990-09-15&art.idGruppo=0&art.idSottoArticolo=1>

21 Synthesis s.r.l. <https://www.synthesisr.com/matrice-terreno.html>

Nel caso di *campioni da prelevare in profondità*, si ricorre alla raccolta del terreno mediante carotieri, metodi a tubo diviso, a tubo solido o idraulici. In tale tipologia di campionamento, è necessario rimuovere la parte esterna della carota stessa, che ha subito maggiori alterazioni dovute al contatto con il carotiere; quindi, bisogna prelevare il nucleo avendo cura di eliminare tutto il materiale estraneo al terreno e la sua parte più grossolana²².

Il monitoraggio prevede che per ogni campione, vengano analizzati contaminanti, tra cui metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB), diossine (PCDD) e furani (PCDF) per i quali sono fissati valori limite dal D.Lgs. 152/2006²³, poiché la loro presenza anche in concentrazioni molto basse, può risultare pericolosa per la salute umana e per l'ambiente.²⁴

1.2. I rischi legati al rilascio di composti inquinanti nell'ambiente

Il rilascio di composti inquinanti nell'ambiente costituisce una minaccia seria, con effetti potenzialmente dannosi per *la salute umana*.

1.2.1. La salute umana

Le esposizioni ambientali danneggiano la salute umana in tutto il mondo: l'aria inquinata, l'acqua, il suolo ed il cibo, espongono gli esseri umani di tutte le età a una quantità enorme di sostanze chimiche e di fattori di stress ambientale²⁵. L'inquinamento atmosferico, delle acque e del suolo, sono fortemente correlati tra loro; costituiscono il fattore con maggiore impatto sulla salute umana, nonché influenzano notevolmente la comparsa di malattie soprattutto di tipo respiratorio e

²²<https://www.synthesissrl.com/matrice-terreno.html>

²³ D.Lgs. 152/2006 (03/04/2006)

(<https://www.normattiva.it/urires/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2006-04-03;152>)

²⁴ ISPRA Contaminazione diffusa: introduzione ed esperienza piemontese, Renzo Barberis e Gabriele Fabietti (Arpa Piemonte)

<https://www.isprambiente.gov.it/files/eventi/eventi-2015/ricerca-siti-inquinati/Barberis.pdf>

²⁵ ARPAE, Francesco Forastiere (<https://www.arpae.it/it/notizie/ambiente-e-salute-l-urgenza-dei-sogni>)

cardiovascolare. Nel 1973, Williamson ha introdotto una distinzione tra contaminante e inquinante. Secondo la sua definizione, un contaminante è "qualunque sostanza aggiunta all'ambiente che provoca una variazione dalla composizione chimica naturale".²⁶ Gli inquinanti, invece, sono sostanze o fattori fisici (ad esempio, calore o rumore) che interferiscono con il naturale funzionamento degli ecosistemi: possono essere già presenti in natura, o derivare dalle attività dell'uomo.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che oltre il 25% delle malattie negli adulti ed oltre il 33% nei bambini sotto i 5 anni siano dovute a cause ambientali e che siano circa 13 milioni le morti attribuibili annualmente ad esposizioni ambientali, di cui oltre 7 milioni legate al solo inquinamento atmosferico. Inoltre ha stilato una lista dei 10 fattori ambientali a maggior rischio per la salute umana e tra questi ci sono: inquinamento dell'aria, metalli pesanti (arsenico, cadmio, piombo, mercurio), diossine, pesticidi, benzene, le polveri fini e l'ozono.²⁷

Ogni volta che respiriamo, gas come il diossido di azoto e il biossido di zolfo, insieme a particelle inquinanti come le PM10 e le PM2,5, entrano nelle nostre vie respiratorie e raggiungono i polmoni. Questi inquinanti si depositano negli alveoli e nei bronchi, dove possono avere effetti dannosi sulla salute sia a breve che a lungo termine. Le conseguenze possono andare da tosse e bronchiti acute o croniche fino a problemi più seri come disturbi cardiocircolatori, ictus, difficoltà respiratorie e tumori polmonari. Più l'aria è inquinata, maggiormente si verificano questi problemi.²⁸

Secondo un'analisi effettuata dall'European Environment Agency (EEA), a causa dell'inquinamento atmosferico, nel 2020 circa il 96% della popolazione dell'UE, è risultato esposto a concentrazioni di particolato fine (PM_{2,5}) superiori alla soglia di 5 µg/m³ d'aria, stabilito dalle linee guida dell'OMS, il quale risulta essere uno degli inquinanti atmosferici più letale. In Italia, quasi un quinto della popolazione respira

26 Williamson, S. J. (1973). *Fundamentals of air pollution. (No Title)*.

27Ambiente e salute, Patrizia Gentilini (<https://www.saluteinternazionale.info/2020/01/ambiente-e-salute/?pdf=17203>)

28 UFAM Effetti dell'inquinamento atmosferico sulla salute
<https://www.bafu.admin.ch/bafu/it/home/temi/aria/info-specialisti/effetti-dell-inquinamento-atmosferico/effetti-dell-inquinamento-atmosferico-sulla-salute.html>

aria con una concentrazione di particolato fine superiore ai 20 µg/m³, difatti insieme alla Polonia risulta essere una delle maggiori esposte all'inquinamento atmosferico. EEA, (2023)²⁹, OPENPOLIS, (2023)³⁰

Il rilascio di queste sostanze inquinanti nelle acque può contaminare le fonti idriche, mettendo a rischio la salute umana anche attraverso il consumo di acqua contaminata e l'accumulo di sostanze nocive negli organismi acquatici, utilizzati nell'alimentazione.³¹ Inoltre, queste sostanze possono infiltrarsi nel suolo, alterandone la qualità e la fertilità. Il suolo contaminato può influire negativamente sulle colture agricole, portando all'accumulo di inquinanti nei prodotti alimentari e, di conseguenza, nell'uomo e negli animali che li consumano.

1.3. L'ecotossicologia

1.3.1. Introduzione all'ecotossicologia

Il termine "ecotossicologia" è stato introdotto per la prima volta nel 1969 da Truhaut³², il quale ha riunito in un unico concetto i termini "ecologia" e "tossicologia".

L'ecotossicologia è una disciplina che si occupa dello studio degli effetti tossici causati da sostanze inquinanti naturali o sintetiche sui costituenti degli ecosistemi, animali, vegetali e microrganismi.

Si occupa anche di studiare come le sostanze pericolose si spostano e dove vanno nell'ambiente. Questo studio è fondamentale per valutare quanto gli esseri viventi, a tutti i livelli (individui, gruppi, ecosistemi), possano essere esposti a queste sostanze. L'obiettivo è calcolare il rischio che le emissioni di sostanze tossiche comportano.

La finalità della sperimentazione tossicologica, sia nella tradizionale tossicologia che nell'ecotossicologia, è quella di stabilire le quantità massime di sostanze potenzialmente dannose che possono essere tollerate per proteggere adeguatamente ciò che si vuole preservare. Nella tossicologia convenzionale, questo si riferisce alla

29 Eea, (2023). <https://www.eea.europa.eu/it/highlights/le-morti-premature-causate-dallinquinamento>

30 Openpolis, (2023). <https://www.openpolis.it/il-nord-italia-e-la-zona-piu-inquinata-deuropa/>

31 <https://www.auxologico.it/acqua-salute-ambiente>

32Truhaut, R. (1977). Ecotossicologia; obiettivi, principi e prospettive. *Ecotossicologia e sicurezza ambientale* 1, 151–173

salute umana, mentre nell'ecotossicologia riguarda tutte le comunità biologiche negli ecosistemi acquatici e terrestri. In entrambi i casi, uno dei principali ostacoli è capire come applicare i dati ottenuti dalla sperimentazione al nostro scopo finale.

Nel campo della tossicologia, gli studi possono coinvolgere i tradizionali animali da laboratorio (ratti, topi), ma l'obiettivo è sempre tradurre i risultati in termini di rischi per l'uomo. Al contrario, nell'ecotossicologia il bersaglio da proteggere non è rappresentato da una singola specie ma dagli ecosistemi, rendendo la valutazione più complessa. Inoltre, visto che è impossibile testare una sostanza su tutte le specie, è necessario estrapolare le conclusioni da un campione limitato e applicarle a un vasto numero di organismi viventi.

Le differenze tra la tossicologia convenzionale e l'ecotossicologia vanno oltre il tipo di obiettivo di protezione, coinvolgendo anche il metodo di protezione scelto. La tossicologia umana mira a proteggere ogni singolo individuo, non solo da eventi letali, ma anche da quelli subletali e cronici. D'altra parte, l'ecotossicologia mira a mantenere la struttura e il funzionamento degli ecosistemi, dove la mortalità di parte della popolazione è un fenomeno naturale regolato dagli equilibri ecologici. Questa mortalità è causata sia dalle relazioni tra gli organismi viventi, come competizione e predazione, sia dall'effetto di fattori non biotici, come le condizioni climatiche sfavorevoli che colpiscono gli individui più deboli.³³ Al fine di verificare se un campione ambientale può essere potenzialmente tossico, si possono effettuare dei “test tossicologici” ovvero dei saggi di durata variabile, condotti secondo protocolli definiti, che utilizzano un sistema biologico come bersaglio (es. molecole, cellule, organismi, popolazioni e comunità. Gli organismi possono essere studiati sia in laboratorio, attraverso prove di tossicità, sia nel loro ambiente naturale, fungendo da indicatori delle condizioni ambientali e dei livelli di contaminazione. Generalmente, il saggio implica l'esposizione di un organismo vivente a una sostanza per un certo periodo, seguita dall'analisi della risposta manifestata dall'organismo stesso (Maffiotti et al., 1997).³⁴

33C.L. Galli et al., Tossicologia, Edizione Piccin, 2016

34 Maffiotti et al., Introduzione all'ecotossicologia, Pitagora Editrice, 1997

1.3.2. Gli organismi modello

Gli organismi utilizzati nei saggi ecotossicologici, tra cui piante, animali e batteri, reagiscono diversamente alle sostanze tossiche in base all'ambiente in cui vivono (acquatico o terrestre) e alle loro specifiche caratteristiche tassonomiche e fisiologiche. È cruciale conoscere le principali vie di esposizione di questi organismi nei loro habitat naturali per sviluppare metodi di saggio ecotossicologico che siano davvero rappresentativi per ciascuna specie. Ecco una descrizione sintetica delle vie di esposizione per diversi gruppi di organismi:

1. **Organismi unicellulari (alghe, batteri):** L'esposizione avviene sempre tramite l'acqua, attraversando la membrana cellulare dall'ambiente esterno al citoplasma.
2. **Piante acquatiche e terrestri:** L'esposizione alle sostanze tossiche avviene per assorbimento fogliare dall'acqua o dall'aria, oppure per assorbimento radicale dall'acqua interstiziale del suolo.
3. **Animali acquatici (vertebrati e invertebrati):** Questi animali assorbono le sostanze tossiche dall'acqua attraverso le superfici respiratorie (branchie o superfici cutanee negli invertebrati inferiori). L'esposizione alimentare è significativa solo per quelle sostanze che tendono a bioaccumularsi e a trasferirsi lungo le catene alimentari, come le sostanze ad alta lipofilia.
4. **Animali terrestri epigei (vertebrati e invertebrati):** Gli animali che vivono sopra la superficie del suolo possono essere esposti alle sostanze tossiche per inalazione o contatto, ma la principale via di intossicazione è quella alimentare.
5. **Animali terrestri ipogei (vertebrati e invertebrati):** Questi animali, che costituiscono la fauna del suolo e sono principalmente invertebrati come i lombrichi, e alcune specie di vertebrati, sono esposti alle sostanze tossiche principalmente attraverso la pelle, facilitata dall'acqua interstiziale del suolo, e tramite l'alimentazione.

I SAGGI IN AMBIENTE ACQUATICO:

Nel caso dell'ambiente acquatico i saggi vengono frequentemente condotti su 4 tipi di organismi: alghe unicellulari, crostacei planctonici, pesci e batteri acquatici.

I SAGGI SULLE ALGHE UNICELLULARI

Questi organismi sono selezionati per rappresentare la componente vegetale degli ecosistemi acquatici e, dal punto di vista ecologico e trofico, sono considerati produttori primari. Le specie comunemente utilizzate appartengono al gruppo delle Clorofitee, come *Raphidocelis subcapitata*. Il metodo si basa sul confronto tra la crescita di una popolazione di alghe in un mezzo di coltura di controllo e quella di popolazioni della stessa specie in un mezzo di coltura arricchito con diverse concentrazioni della sostanza da analizzare. Le camere di esposizione sono poste in un termostato, con condizioni standard di illuminazione e senza limitazioni nutrizionali. L'effetto della sostanza tossica viene valutato in termini di inibizione della crescita della popolazione, generalmente dopo 72 o 96 ore, rispetto alla crescita nel controllo, e viene espresso come percentuale di crescita algale. L'endpoint misurato è dunque, l'inibizione della crescita algale contro il controllo, i dati acquisiti possono consentire la determinazione di alcuni parametri, tra i quali risulta di interesse la stima della EC₅₀.

SAGGI SUI MICROCROSTACEI:

Questi saggi vengono effettuati su invertebrati acquatici, rappresentanti i consumatori primari nella catena trofica. L'organismo più comunemente utilizzato è il crostaceo cladocero *Daphnia magna*. In condizioni ambientali favorevoli, questo organismo si riproduce per partenogenesi, con le femmine adulte che possono dare alla luce 10-15 giovani ogni 4-5 giorni, rendendo facilmente disponibili stadi giovanili per i saggi. Gruppi di solito composti da 10 individui, con due o più repliche, vengono esposti a diverse concentrazioni della sostanza da analizzare. Gli individui immobilizzati vengono contati generalmente non oltre le 48 ore.

SAGGI SUI BATTERI:

I batteri sono i decompositori nella catena trofica e hanno la caratteristica di emettere luce. Questi saggi sui batteri acquatici sono solitamente a breve termine (da 5 a 30 minuti) e si effettuano su specie come *Vibrio fischeri*, spesso utilizzando metodi

semiautomatizzati come il Microtox. In questo saggio, l'effetto da misurare è la diminuzione della bioluminescenza che risulta proporzionale alla vitalità batterica.

SAGGI SUI PESCI:

Vengono utilizzati in quanto rappresentanti dei vertebrati e del livello trofico dei consumatori secondari. In Europa, le specie più utilizzate sono la trota iridea e lo zebrafish. I saggi vengono condotti su individui giovani, più sensibili, verificando l'incidenza della mortalità a diversi intervalli temporali (24, 48, 72 e 96 ore) dopo l'esposizione a diverse concentrazioni della sostanza.

I SAGGI IN AMBIENTE TERRESTRE:

Sebbene l'ecotossicologia terrestre abbia una storia più breve rispetto a quella acquatica, negli ultimi anni ha fatto molti progressi. Tra i saggi terrestri più comuni ci sono:

- 1) Saggi sulla microflora e flora del suolo: sono essenziali poiché rappresentano i produttori primari del suolo (es. sorgo e crescita).
- 2) Saggi sugli invertebrati del suolo: solitamente si utilizzano lombrichi, ma anche artropodi dell'ambiente ipogeo.
- 3) Saggi su api e altri insetti utili.
- 4) Saggi sui vertebrati: solitamente si utilizzano uccelli, mentre i mammiferi sono più comunemente usati nella tossicologia tradizionale.

Nei saggi nell'ambiente ipogeo, gli organismi (batteri, piante e lombrichi) sono generalmente esposti al terreno contaminato. Al contrario, nell'ambiente epigeo, l'esposizione per api e uccelli avviene attraverso l'alimentazione o il contatto.

1.3.3. Tossicologia acqua, suolo e aria

La tossicologia ebbe origine nel Rinascimento grazie a Paracelso, si deve a lui la moderna classificazione delle sostanze tossiche.³⁵ Inoltre, ebbe un ruolo molto importante nel definire la differenza tra un tossico ed una sostanza terapeutica.

³⁵ Piero Dolara. – Firenze: Firenze university press, 2006

“Cosa c’è che non sia tossico? Tutte le sostanze sono tossiche e nessuna è priva di tossicità. Solo la dose determina se una sostanza non è tossica” (Paracelso 1493-1541).

La tossicologia è quella scienza che studia gli effetti avversi degli agenti chimici sull’organismo vivente. Questa disciplina ha come obiettivo principale la stima del rischio per l’uomo al fine di sviluppare, se necessario, adeguate misure preventive e/o restrittive.³⁶

È fondamentale la differenza tra effetto e risposta. L'effetto si riferisce al tipo di danno, ossia alla funzione biologica compromessa (come la sopravvivenza o il tasso di crescita). La risposta, invece, consiste nella quantificazione dell'effetto ed è espressa come percentuale di incidenza in una determinata popolazione.

I principali fattori che determinano l'effetto tossico in un organismo sono:

- a) le caratteristiche chimico-fisiche della sostanza contaminante, come la sua idrofilia o lipofilia. Queste caratteristiche possono influenzare l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo, il bioaccumulo e l'escrezione della sostanza. Ad esempio, una sostanza idrofila può essere pericolosa per un organismo ma non bioaccumulare, mentre una sostanza lipofila tende ad accumularsi all'interno dell'organismo, raggiungendo concentrazioni più elevate.
- b) Il target della sostanza, che dipende dalla specie animale o vegetale, può determinare effetti diversi su organismi diversi.
- c) La dose o concentrazione della sostanza, nota anche come "effetto della dose". A seconda della sostanza, le caratteristiche tossicologiche possono variare, con sostanze diverse che mostrano tossicità a concentrazioni diverse. Ad esempio, nella tossicità sui ratti (dose letale per il 50% dei ratti), la caffeina può essere letale a 200 mg/kg, mentre la diossina di Seveso lo è a 0,01 mg/kg, facendone la sostanza più tossica per l'uomo. Un contaminante ambientale non è necessariamente tossico; per diventare tale, deve raggiungere una certa concentrazione o dose all'interno di un organismo. La figura 1.1 mostra la relazione tra la dose di una sostanza e la risposta di un sistema biologico. Generalmente, esiste una soglia sotto la quale la sostanza non provoca effetti negativi. Ad esempio,

36 Allegrucci Massimo, Principi di Tossicologia, (2009)

alcuni metalli pesanti, che sono necessari come micronutrienti, possono causare carenze se non presenti in quantità sufficienti. Superata questa soglia, l'organismo attiva i suoi meccanismi di difesa e detossificazione. Quando i meccanismi di difesa non riescono più a contrastare l'azione tossica, si manifestano effetti cronici, che possono evolvere in effetti acuti a dosi più elevate.

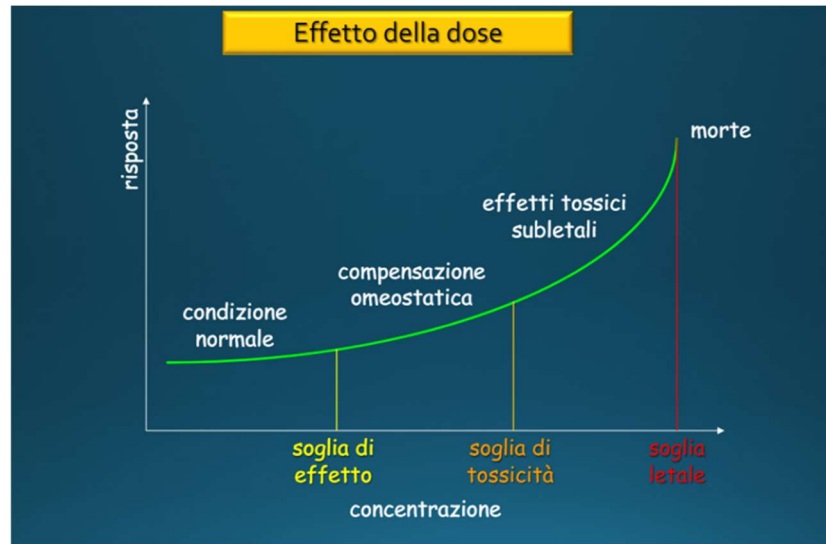


Figura 3- Curva effetto della dose (università statale di Milano)³⁷

Nello studio della tossicologia e dell'ecotossicologia, la relazione tra la dose di una sostanza e la risposta dell'organismo è rappresentata da diverse tipologie di curve. In questo lavoro, la curva utilizzata è quella raffigurata in figura 1.2.

37 Università statale di Milano

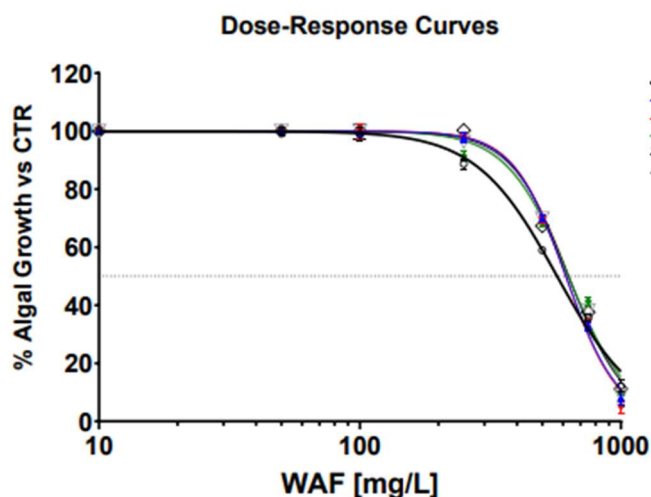


Figura 4- Curva dose-risposta ottenuta dal saggio algale, che mostra la percentuale di crescita delle alghe.

Questa curva è ottenuta tramite saggi ecotossicologici in laboratorio, basati su dati sperimentali. Concettualmente, sull'asse delle ordinate al 100% si osserva una mancanza di effetto della concentrazione della matrice o sostanza sugli organismi trattati contro il controllo. All'aumentare della concentrazione, si inizia a notare l'insorgere di un effetto e un aumento della risposta.

È cruciale, in caso di presenza di una risposta da parte degli organismi, analizzare l'EC (Effect Concentration) 50. Questo parametro è fondamentale per determinare la concentrazione di una sostanza o matrice che provoca un effetto sul 50% degli organismi testati, rappresentando una soglia critica. Inoltre, su di essa può essere analizzata la NOEC (No Observed Effect Concentration), che rappresenta la concentrazione alla quale non si osserva alcun effetto sugli organismi testati.

Tossicologia aria

L'inquinamento atmosferico viene inteso come la presenza nell'atmosfera di sostanze che causano un effetto misurabile sull'uomo e sull'ambiente. Tali sostanze non sono presenti normalmente nell'aria e vengono definite "inquinanti", i quali possono essere di origine antropica oppure di origine naturale. Possono inoltre differenziarsi in primari, se liberati nell'ambiente come tali (es. biossido di zolfo e monossido di azoto) o secondari, se si formano successivamente in atmosfera attraverso reazioni chimico-fisiche (es. ozono). I contaminanti dell'aria sono dati per lo più dalle attività antropiche, dovute ad attività industriali, gli impianti per la produzione di energia, gli impianti di riscaldamento e il traffico.

La normativa di riferimento in tema di qualità dell'aria è il D.lgs. 155/2010 e smi, il quale recepisce a livello italiano la direttiva 2008/50/UE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa. Tale decreto legifera i livelli in aria ambiente di biossido di zolfo (SO₂), biossido di azoto (NO₂), ossidi di azoto (NO_x), monossido di carbonio (CO), particolato (PM10 e PM2.5), benzene (C₆H₆), ozono (O₃) ed IPA³⁸.

L'inquinamento atmosferico ha spesso numerose conseguenze sulla salute. Quando è presente un rapido aumento delle concentrazioni dei contaminanti nell'aria abbiamo un inquinamento acuto. In tali situazioni, l'esposizione ad alte concentrazioni a vari inquinanti atmosferici può provocare una riduzione della funzionalità polmonare, un aumento delle malattie respiratorie nei bambini, attacchi acuti di bronchite e un peggioramento dell'asma. Questo comporta un significativo incremento del numero di decessi tra le persone più sensibili a determinati inquinanti, come anziani e persone con malattie respiratorie e cardiovascolari. Gli effetti dell'inquinamento a basse concentrazioni e per lungo tempo sono più difficili da rilevare. Si ritiene che possano causare la comparsa di malattie polmonari croniche (come bronchite cronica ed asma), la formazione di cancro ai polmoni e le leucemie, un aumento della mortalità per malattie cardiovascolari e respiratorie. L'aria inquinata delle grandi aree urbane e industriali è ricca di contaminanti che possono agire sia singolarmente che in sinergia. Di seguito sono riportati gli effetti sulla salute causati dai principali inquinanti.

Ossidi di azoto (NO_x)

Comprendono il monossido (NO) e il biossido di azoto (NO₂). L'ossido di azoto è un gas inodore e incolore che costituisce il componente principale delle emissioni di ossidi di azoto nell'aria e viene gradualmente ossidato a NO₂. Il biossido di azoto ha un colore rosso-bruno ed è caratterizzato, ad alte concentrazioni, da un odore pungente e soffocante.

La pericolosità degli ossidi di azoto e in particolare del biossido è legata anche al ruolo che essi svolgono nella formazione dello smog fotochimico. In condizioni meteorologiche di stabilità e di forte insolazione (primavera-estate), le radiazioni ultraviolette

38 D.lgs. 155/2010 e smi (13/08/2010) (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2010-08-13:155>)

possono determinare la dissociazione del biossido di azoto e la formazione di ozono, che può ricombinarsi con il monossido di azoto e ristabilire una situazione di equilibrio. Ha origini antropiche, Le fonti antropiche, originata da tutte le reazioni di combustione, comprendono principalmente gli autoveicoli, le centrali termoelettriche e il riscaldamento domestico.

Gli effetti tossici che l'NO₂ causa all'uomo non sono del tutto chiari anche se è noto che provoca gravi danni alle membrane cellulari provocando infiammazione delle mucose e decremento della funzionalità polmonare.

Limiti normativi con il D.lgs. 155/2010:

- Soglia di allarme (superamento per 3 ore consecutive del valore soglia): 400 µg/m³
- Limite orario per la protezione della salute umana (media 1 ora): 200 µg/m³ da non superare più di 18 volte per anno civile
- Limite annuale per la protezione della salute umana (media annua): 40 µg/m³

mentre i valori guida dell'OMS sono di media annuale 10 µg/m³ e media 24 ore: 25 µg/m³ ³⁹.

Monossido di carbonio (CO)

Prodotto dalla combustione incompleta delle sostanze contenenti carbonio, è un gas incolore e inodore. Le fonti antropiche sono costituite dagli scarichi delle automobili, soprattutto a benzina, dal trattamento e smaltimento dei rifiuti e dalle industrie e raffinerie di petrolio.

Il CO raggiunge facilmente gli alveoli polmonari e quindi il sangue dove compete con l'ossigeno per il legame con l'emoglobina, riducendo notevolmente la capacità del sangue di portare ossigeno ai tessuti, causando danni come l'ipossia a carico del sistema nervoso, cardiovascolare e muscolare, con conseguente alterazione della pressione sanguigna, accelerazione del battito cardiaco e possibili emorragie.

39 ARPA Veneto <https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>

Limiti normativi con il D.lgs. 155/2010 per la protezione della salute umana (massimo giornaliero della media mobile 8 ore) è di 10 mg/m³, mentre i valori guida dell'OMS (media 24 ore): 4 µg/m³ ⁴⁰.

Ozono (O₃)

È un gas bluastro dall'odore leggermente pungente che non viene direttamente emesso come tale dalle attività umane. È un inquinante che si forma nell'atmosfera in seguito alle reazioni fotochimiche di inquinanti precursori prodotti dai processi di combustione (NO_x, idrocarburi). Le concentrazioni ambientali di O₃ tendono ad aumentare durante i periodi caldi e soleggiati dell'anno. A livello cellulare l'O₃ agisce interferendo con alcuni processi metabolici fondamentali e provocando il danneggiamento delle membrane degli organelli cellulari. Il bersaglio principale dell'O₃ è l'apparato respiratorio, causando secchezza della gola e del naso, aumento della produzione di muco, tosse, faringiti, bronchiti, diminuzione della funzionalità respiratoria, dolori toracici, diminuzione della capacità battericida polmonare, irritazione degli occhi, mal di testa.

Limiti normativi con il D.lgs. 155/2010:

- Soglia di informazione (superamento del valore orario): 180 µg/m³
- Soglia di allarme (superamento del valore orario): 240 µg/m³
- Obiettivo a lungo termine per la protezione della salute umana (massimo giornaliero della media mobile 8 ore): 120 µg/m³
- Valore obiettivo per la protezione della salute umana (massimo giornaliero della media mobile 8 ore): 120 µg/m³ da non superare per più di 25 giorni all'anno come media su 3 anni

mentre i valori guida dell'OMS sono di massimo stagionale (60 µg/m³) e media (8 ore): 100 µg/m³ ⁴¹

Particolato atmosferico (PM)

Il particolato è costituito da un insieme estremamente eterogeneo di particelle la cui origine può essere primaria (emesse come tali) o secondaria (derivata da una serie di

40 ARPA Veneto (<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)

41ARPA Veneto (<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)

reazioni fisiche e chimiche). Il particolato può essere caratterizzato in base alla dimensione media delle particelle: il PM10 ha particelle di dimensioni intorno ai 10 µm, il PM2,5 invece ha particelle di dimensioni intorno ai 2,5 µm.

Le fonti antropiche di PM10 e PM2,5 sono essenzialmente la combustione della biomassa per il riscaldamento domestico (69%), il traffico veicolare (13%), e le attività agricole (4%).

La dimensione delle particelle e la loro composizione chimica sono determinanti ai fini del grado di penetrazione all'interno del tratto respiratorio, causando effetti irritativi locali come secchezza e infiammazione e quelle che si depositano nella trachea, bronchi e bronchioli, causando malattie respiratorie croniche (es. asma, bronchite ed enfisema).

Limiti normativi con il D.lgs. 155/2010:

- PM10 - Limite di 24 ore per la protezione della salute umana (media 24 ore): 50 µg/m³ da non superare più di 35 volte per anno civile;
- PM10 - Limite annuale per la protezione della salute umana (media annuale): 40 µg/m³
- PM2.5 - Valore limite per la protezione della salute umana (media annuale): 25 µg/m³

mentre i valori guida dell'OMS sono:

- PM10 - media annuale: 15 µg/m³
- PM10 - media 24 ore: 45 µg/m³
- PM2.5 - media annuale: 5 µg/m³
- PM2.5 - media 24 ore: 15 µg/m³ ⁴²

Benzene (C6H6)

È un liquido incolore ed è un idrocarburo aromatico tipico costituente delle benzine.

42 ARPA Veneto (<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)

Le principali fonti di emissione sono costituite dal traffico, dalla combustione della biomassa e dal settore industriale.

L'intossicazione di tipo acuto è dovuta all'azione del benzene sul sistema nervoso centrale, causando stordimento e debolezza, mal di testa, respiro affannoso, senso di costrizione al torace. A livelli più elevati si registrano eccitamento, euforia, seguiti da fatica e sonnolenza e, nei casi più gravi, arresto respiratorio, spesso associato a convulsioni ed infine alla morte.

Il benzene è stato inserito da International Agency for Research on Cancer (IARC) nel gruppo 1 cioè tra le sostanze che hanno un accertato potere cancerogeno sull'uomo.

Limiti normativi con il D.lgs. 155/2010 è limite annuale per la protezione della salute umana (media annuale) di $5.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$, mentre non esistono valori guida dell'OMS⁴³.

Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Sono costituiti da due o più anelli aromatici condensati e derivano dalla combustione incompleta di numerose sostanze organiche. La fonte più importante di origine antropica è rappresentata dalla combustione della biomassa per il riscaldamento domestico, seguita dalle centrali termoelettriche e dagli inceneritori.

Gli IPA sono in grado di raggiungere facilmente la regione alveolare del polmone, il sangue e quindi i tessuti, causando oltre ad irritazioni ed effetti cancerogeni. Gli IPA sono stati inseriti nel gruppo 1 della classificazione IARC.

Limiti normativi con il D.lgs. 155/2010 è un valore obiettivo (media annuale): $1.0 \text{ ng}/\text{m}^3$, mentre non esistono valori guida dell'OMS⁴⁴.

Tossicologia acqua

Il termine inquinamento idrico si riferisce alla contaminazione dell'acqua provocata dall'introduzione di sostanze come prodotti chimici, scarichi industriali e urbani, che alterano la qualità dell'acqua e ne compromettono gli usi quotidiani. L'inquinamento

43 ARPA Veneto (<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)

44 ARPA Veneto (<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)

idrico può avvenire principalmente in due modi: diretto e indiretto. Nel caso diretto, le sostanze inquinanti vengono immesse nei corsi d'acqua senza alcun trattamento di depurazione. L'inquinamento indiretto si verifica invece quando le sostanze nocive raggiungono i corsi d'acqua attraverso l'aria e il suolo, ad esempio, tramite il dilavamento del terreno contaminato. L'inquinamento chimico dei corsi d'acqua è uno dei problemi ambientali più critici. A sua volta può dividersi in inquinamento da sostanze organiche e inorganiche. Per quanto riguarda le sostanze organiche sicuramente le più importanti sono quelle causate da idrocarburi (petrolio) e quelle causate dai fertilizzanti (responsabili del fenomeno dell'eutrofizzazione). L'inquinamento da sostanze inorganiche è causato dai metalli pesanti come ad esempio il mercurio, il cromo ed il piombo. Le conseguenze per la salute umana possono essere gravi. Le vongole, che filtrano l'acqua di mare, accumulano nei loro tessuti sostanze inquinanti come i metalli pesanti attraverso il processo di bioaccumulazione, raggiungendo livelli tossici per gli esseri umani. Anche le fogne costituiscono un grave problema, rilasciando acque contaminate da virus e batteri, responsabili di malattie come l'epatite e il tifo. L'assunzione di tali agenti patogeni da parte di molluschi destinati al consumo umano, come mitili, ostriche e altri molluschi commestibili allevati vicino agli scarichi, può scatenare gravi epidemie. È di primaria importanza adottare misure concrete per contrastare l'inquinamento idrico. Tra queste, l'installazione di impianti di depurazione delle acque reflue riveste un ruolo chiave nel mitigare l'impatto negativo sull'ambiente acquatico. Per affrontare l'inquinamento derivante dalle pratiche agricole, è essenziale considerare l'utilizzo di approcci più sostenibili. Ciò potrebbe implicare l'utilizzo di tecniche agricole che riducono l'impiego di sostanze inquinanti, contribuendo così a limitare la contaminazione delle risorse idriche sotterranee e dei suoli agricoli. Inoltre, la transizione verso un'agricoltura biologica potrebbe rappresentare una soluzione efficace per ridurre l'uso eccessivo di fertilizzanti chimici, contribuendo così a preservare la qualità delle acque.

Tossicologia del suolo

L'inquinamento del suolo è un fenomeno che altera chimicamente il terreno a causa dell'attività umana, la quale produce rifiuti non biodegradabili sotto forma di solidi, liquidi e gas. Questa contaminazione da parte di sostanze chimiche in quantità eccessive modifica le caratteristiche del suolo, compromettendo le sue funzioni

protettive, produttive ed ecologiche. Tale inquinamento provoca anche problemi alle acque sotterranee e superficiali, all'atmosfera e alla catena alimentare, incidendo sulla salute umana. A livello economico, i danni si manifestano nelle spese per la bonifica, il ripristino ambientale e la perdita di valore delle aree contaminate. Le principali sostanze chimiche che contaminano il suolo includono metalli pesanti, composti organici e nitrati. Le principali forme di inquinamento del suolo sono:

- 1) L'agricoltura intensiva: l'uso di macchinari agricoli provoca la compattazione del terreno, alterando il suo comportamento naturale. Le pratiche agricole intensive prevedono l'uso di fitofarmaci e fertilizzanti chimici, che possono causare un eccesso di nutrienti, metalli pesanti e la diffusione di sostanze bioacide. Inoltre, un'agricoltura eccessiva può rendere il suolo impermeabile, impedendogli di svolgere le sue funzioni vitali.
- 2) L'industria contribuisce notevolmente all'inquinamento del suolo, emettendo acidificanti, metalli pesanti e composti organici come idrocarburi, che ricadono sul terreno dall'atmosfera o vengono direttamente rilasciati su di esso.
Fra le cause principali si contano: rifiuti non biodegradabili, acque di scarico, prodotti fitosanitari, fertilizzanti, idrocarburi, diossine, metalli pesanti e solventi organici.

Gli effetti principali sulla salute umana derivano dal contatto diretto con terreni contaminati. Molte malattie sono causate dall'assunzione di acqua contaminata, dall'ingresso di sostanze tossiche nella catena alimentare (ad esempio tramite il consumo di animali che hanno pascolato su terreni inquinati) e dall'inalazione di composti volatili. Gli effetti dannosi sulla salute possono essere numerosi e specialmente a livello cronico. La gravità del danno varia in base a diversi fattori, tra cui il tipo e la quantità di contaminante, le modalità e la durata dell'esposizione. Metalli pesanti come il piombo sono estremamente pericolosi per i bambini piccoli, nei quali possono causare gravi danni al cervello e al sistema nervoso; negli adulti, invece, possono provocare seri danni ai reni. Anche il mercurio è noto per aumentare l'incidenza di danni renali, talvolta irreversibili. Oltre a questi effetti gravi, esistono molti altri sintomi più lievi e meno pericolosi, come nausea, mal di testa, affaticamento e irritazioni oculari.

1.3.4. Tossicità cronica, subcronica e acuta

Esistono due tipi principali di tossicità: la **tossicità acuta** e quella **cronica**.

La tossicità acuta valuta la rapida insorgenza di effetti come la morte, l'immobilizzazione o la perdita completa di una funzione vitale. Tra i parametri più importanti che si possono stimare è presente l' EC_{50} (Effect Concentration), che rappresenta la concentrazione di campione che induce un effetto sul 50% della popolazione su cui viene effettuato il saggio.⁴⁵ Abbiamo in seguito anche la LC (Lethal Concentration) 50 che rappresenta la concentrazione di una sostanza/campione che è in grado di uccidere il 50% degli organismi esposti ad un saggio per un certo periodo⁴⁶. Infine possiamo analizzare anche la IC (Inhibitory Concentration) 50 che indica la concentrazione della sostanza in grado di inibire il 50% degli organismi trattati. Il tempo di esposizione per la tossicità acuta può variare da pochi minuti (per esperimenti con batteri) a qualche giorno, con un massimo di 96 ore. I vantaggi dell'uso della EC_{50} :

- 1) Indica livelli di esposizione maggiormente affidabili in quanto valuta l'effetto sul 50% della popolazione. Se si valutasse l' EC_{10} (sul 10% della popolazione) andremmo a considerare solo l'effetto del tossico ai danni dei minus varianti e quindi risulterebbe poco affidabile.
- 2) Permette di svolgere dei confronti: provando più sostanze ed analizzando le corrispettive IC_{50} (nella daphnia), si può dedurre che la sostanza più pericolosa è quella con il valore più basso (minore concentrazione per immobilizzare il 50% delle daphnie).

La tossicità cronica, d'altra parte, valuta l'effetto che si verifica in un periodo di tempo piuttosto elevato (generalmente per una esposizione superiore ad 1/10 del ciclo vitale

45 APAT 2002

(https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/APAT_Guida_tecnica_indicatori_2002.pdf)

46 APAT 2002

(https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/APAT_Guida_tecnica_indicatori_2002.pdf)

dell'organismo testato); produce risposte che non compromettono la sopravvivenza degli organismi.⁴⁷

Gli endpoint misurati per la tossicità cronica sono la NOEC (No Observable Effect Concentration) e la NOED (No Observable Effect Dose) nell'uomo, che rappresentano la concentrazione o la dose al di sotto della quale non si osservano effetti misurabili. La concentrazione necessaria per produrre un effetto cronico è generalmente inferiore rispetto a quella richiesta per un effetto acuto. I saggi di tossicità cronica possono durare per periodi più lunghi, anche giorni o mesi.

La principale differenza tra tossicità **cronica** e **subcronica** risiede nella durata dell'esposizione e nel tempo necessario per sviluppare gli effetti nocivi. La tossicità cronica è associata a esposizioni prolungate nel tempo, mentre quella subcronica si verifica con esposizioni più brevi, anche se ripetute.

Importante è anche l'esposizione contemporanea (cotossicità) a più agenti chimici in quanto rappresenta un problema molto complesso, poiché è causata da una interazione di più sostanze chimiche nell'organismo, che possono dare luogo ad effetti additivi, sinergici o di potenziamento.

- L'effetto addizionale si ha quando l'effetto di due o più sostanze è pari alla somma degli effetti dei singoli composti;
- Il sinergismo si ha quando l'effetto di due o più sostanze è maggiore della somma dei singoli effetti,
- il potenziamento si ha quando la somministrazione di una sostanza non tossica insieme a una tossica aumenta l'effetto finale di quest'ultima.⁴⁸

Uno degli scopi fondamentali della sperimentazione ecotossicologica è identificare le concentrazioni di sostanze potenzialmente tossiche che risultano sicure per l'ambiente. Questi livelli, precedentemente noti come "obiettivi" di qualità ambientale, sono ora

47 APAT 2002

https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/APAT_Guida_tecnica_indicatori_2002.pdf

48 SNPA 05/2017

(https://www.isprambiente.gov.it/files2017/pubblicazioni/manuali-linee-guida/MLG_164_17_Man_rischio_chimico.pdf)

definiti come PNEC (Concentrazioni prevedibili di non effetto). Stabilire le PNEC permette di derivare, a partire da dati sperimentali, un valore per proteggere l'ecosistema.

2. SCOPO DEL LAVORO

La tesi, svolta presso il laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'ambiente del dipartimento "Ambiente e Salute" dell'istituto di Ricerche farmacologiche Mario Negri, è parte integrante del progetto "Elaborazione di una ricerca applicata con piano di monitoraggio ambientale e sanitario nell'ambito della tematica IRCC "Malattie ambientali" e nel contesto della valutazione integrata di impatto ambientale e sanitario". Il lavoro di tesi è stato eseguito sotto la supervisione del Dottor Simone Maiorana.

Questo progetto biennale (dicembre 2022- dicembre 2024) è stato richiesto dal comune di Gorla Maggiore, ha l'obiettivo di valutare la qualità ambientale di un territorio comprendente 14 Comuni distribuiti tra le Province di Varese, Como, Milano, caratterizzato dalla presenza di tre discariche di rifiuti urbani.

Per raggiungere questo obiettivo, il progetto è stato suddiviso in cinque fasi principali:

- 1) Monitoraggio della qualità dell'aria e delle deposizioni atmosferiche;
- 2) Analisi della presenza di metalli e microinquinanti organici nei suoli;
- 3) Esecuzione di saggi di fitotossicità e tossicità cronica su campioni di suolo;
- 4) Esecuzione di saggi di tossicità nell'ambiente acquatico;
- 5) Analisi dei reflui fognari alla ricerca dei residui prodotti dal consumo di farmaci e sostanze illecite;

Il progetto di tesi si è concentrato in particolare sui punti tre e quattro, con l'obiettivo di realizzare saggi ecotossicologici per ottenere una valutazione complessiva della qualità ambientale dell'area esaminata. I saggi effettuati sui campioni di suolo sono stati:

- a) Saggio di fitotossicità sul sorgo e sul crescione
- b) Saggio di tossicità su *E. andrei*

Saggi svolti sui campioni di acqua superficiale:

- a) Saggio di immobilizzazione acuta su *Daphnia magna*
- b) Saggio di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata*
- c) Saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri*

3. MATERIALI E METODI

3.1. Area di studio

L'area del progetto si estende su 14 comuni situati nelle province di Varese, Como e Milano, coprendo una superficie di circa 107 km² (figura 5).



Figura 5- Area geografica sulla quale si sono svolte le indagini

I comuni oggetto dello studio sono: Carbonate, Cislago, Fagnano Olona, Gerenzano, Gorla Maggiore, Gorla Minore, Locate Varesino, Marnate, Mozzate, Olgiate Olona, Origgio, Rescaldina, Solbiate Olona e Uboldo. Il territorio è suddiviso in 21 siti (figura 6), sui quali sono state condotte attività di monitoraggio dell'aria, del suolo e delle acque superficiali.

N. SITO	SITO CAMPIONATO	INDIRIZZO	COMUNE
1	Municipio	Via Don Zanchetta 2	Carbonate (CO)
2	Croce Rossa Italiana Unità Territoriale Cislago	Via C. Battisti, 825	Cislago (VA)
3	Scuola Media "E. Fermi"	Piazza A. Di Dio, 13	Fagnano Olona (VA)
4	Scuola Elementare "Papa Giovanni XXIII"	Via Don L. Sturzo, 13	Gerenzano (VA)
5	Scuola Elementare "E. De Amicis"	Via Mayer, 1	Gorla Maggiore (VA)
6	Parco Olona	Via per Fagnano	Gorla Maggiore (VA)
7	Scuola Media "A. Volta"	Via A. Volta, 1	Gorla Maggiore (VA)
8	Asilo Infantile "E. Candiani"	Via G. Mazzini, 48	Gorla Maggiore (VA)
9	Scuola Materna "San Carlo e Terzaghi"	Via Don L. Milani	Gorla Minore (VA)
10	Scuola Elementare "A. Moro"	Via Vittorio Veneto, 3	Locate varesino (CO)
11	Municipio di Marnate	Piazza S. Ilario, 1	Marnate (VA)
12	Scuola Elementare "L. Castiglioni"	Via Prati Vigani	Mozzate (CO)
13	Scuola Elementare "Ferrini"	Via L. Greppi, 15	Olgiate Olona (VA)
14	Campo Sportivo Comunale	Via A. Diaz, 67	Olgiate Olona (VA)
15	Scuola Media "Schiapparelli"	Via Ai Bosch, 17	Origgio (VA)
16	Pozzo ALFA	Via Martiri della Libertà	Solbiate Olona (VA)
17	Caserma "Ugo Mara"	Via per Busto, 20	Solbiate Olona (VA)
18	Municipio di Rescaldina	Piazza della Chiesa, 15	Rescaldina (MI)
19	Scuola Elementare "A. Manzoni"	Via XX Settembre, 26066	Uboldo (VA)
20	Municipio di Uboldo	Piazza S. Giovanni Bosco, 10	Uboldo (VA)
21	Pozzo della Parrocchia S. Maria Inziata	Zona Boschiva (Piazza E. Toti, 102)	Cislago (VA)

Figura 6- Elenco di tutti i siti sui quali sono stati svolte attività di monitoraggio di aria e suolo.

3.2. Campioni di suolo e di acqua superficiale

Il D.lgs. 152/06 regola il campionamento e l'analisi dei suoli, con limiti per gli inquinanti, mentre ARPA Lombardia fornisce indicazioni sulla gestione dei campioni. Il campionamento dei terreni nelle aree urbanizzate è stato effettuato nel semestre freddo, mentre nel semestre caldo è stato svolto il prelievo di campioni nelle aree rurali. In entrambi i contesti, i campioni sono stati prelevati da una profondità di circa 15 cm.

Per la raccolta dei campioni di suolo, sono stati utilizzati contenitori in vetro. Ogni contenitore è stato identificato con un'etichettatura univoca per garantirne la tracciabilità e la corrispondenza (figura 7).



Figura 7- Campione di suolo arrivato in laboratorio

I campioni di acqua superficiale sono stati prelevati dai corsi d'acqua con il pescante, strumento dotato di un'asta telescopica con all'estremità un becher da 1 litro e sono stati disposti successivamente in contenitori di vetro, apponendo una etichetta con codice univoco di riconoscimento (figura 8).

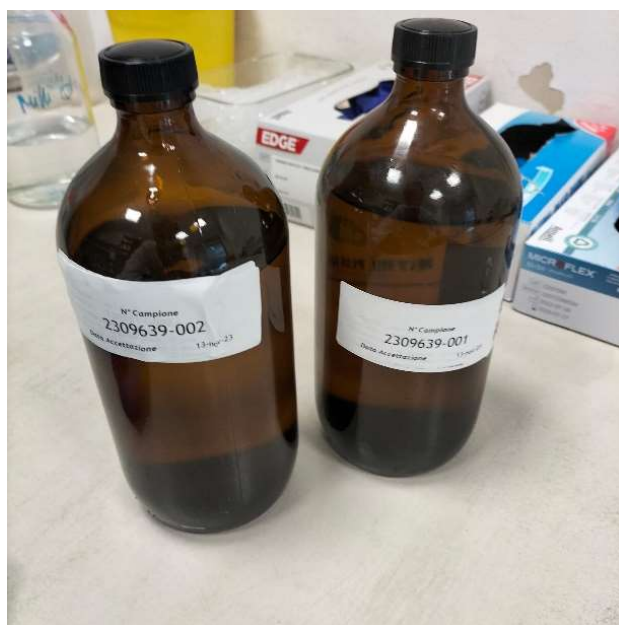


Figura 8 - Campioni di acque superficiali arrivati in laboratorio

Ad oggi sono stati prelevati 17 campioni di suolo (figura 9) e 7 di acqua superficiale (figura 10) i quali vengono sotto riportati:

SITO	CODICE
Gorla Magg. Mayer	2208527-001
Gorla Magg. Parco Olona	2303924-001
Gorla Magg. Volta	2208527-002
Gorla Magg. Candiani	2209363-001
Gorla Min. San Carlo e Terzaghi	2209363-002
Olgiate Olona scuola Ferrini	2209363-003
Olgiate Olona via Diaz	2300616-001
Marnate	2300616-002
Fagnano Olona	2300616-003
Municipio Carbonate	2300616-004
Locate Varesino	2300985-001
Cislago Croce Rossa	2301862-001
Gerenzano	2402390-001
Uboldo Municipio	2309569-002
Uboldo A. Manzoni	2309569-001
Rescaldina	2400628-001
Origgio	2400629-001

Figura 9 - Campioni di suolo sui quali sono stati svolti i saggi terrestri

campioni	id
Gorla maggiore	2401649-001
Gorla maggiore	2401649-002
Mozzate	2401649-003
Carbonate-Locate	2401649-004
Gerenzano	2401649-005
Gerenzano	2309639-001
Gerenzano	2309639-002

Figura 10- Campioni di acque superficiali sui quali sono stati svolti i saggi acquatici

Preparazione dei campioni di suolo

Il terreno campionato arriva in laboratorio accompagnato da un codice identificativo. Per determinare la percentuale di umidità del terreno, viene prelevata un'aliquota variabile tra i 10 e i 15 grammi dal campione. Questa porzione viene disposta in una Petri in vetro, e viene registrato il peso esatto prima dell'essiccamento (P_i). Successivamente, la porzione di terreno viene posta in un forno a 120°C per più di 5 ore (figura 11). Una volta trascorso questo periodo di tempo, è possibile ottenere il peso finale del campione (P_f) dopo l'essiccamento. Per calcolare la percentuale di umidità del terreno ($U\%$) si andrà ad applicare la seguente formula (1):

$$(1) U\% = \left(\frac{P_i - P_f}{P_f} \right) * 100$$



Figura 11- Forno usato per essiccare l' aliquota di terreno per calcolare l'umidità

Tale campione viene successivamente setacciato con un vaglio di 2 mm, al fine di omogeneizzarlo riducendone le parti grossolane (figura 12).



Figura 12- Setaccio con vaglio di 2 mm utilizzato per i suoli

Ottenuta la parte fine del terreno, essa viene disposta su di un foglio di alluminio di dimensioni variabili e lasciato essiccare all'aria a temperatura ambiente per circa 3 – 5 giorni. Il terreno essiccato sarà il nostro campione d'esame effettivo. (figura 13).



Figura 13- Terreni ad areare post setacciatura per 3-5 giorni

Metodo Water Holding Capability (WHC) o capacità di ritenzione idrica del suolo

La capacità di ritenzione idrica (WHC) viene definita come la capacità di una determinata struttura del terreno di trattenere fisicamente l'acqua contro la forza di gravità.

La determinazione della WHC è fondamentale per stabilire la quantità di acqua da impiegare nei saggi di fitotossicità, evitando sia un'eccessiva saturazione del terreno, che potrebbe influenzare la validità dei risultati, sia una carenza idrica, che potrebbe compromettere anch'essa la precisione delle valutazioni.

La procedura di determinazione della WHC prevede l'utilizzo del campione effettivo, lasciato preventivamente ad areare ed inserito successivamente all'interno di un cilindro graduato in una quantità nota. Successivamente verrà addizionata acqua al campione nel cilindro graduato, superiore al rapporto 1:1. Il campione viene sottoposto ad una leggera agitazione, raggiungendo una certa torbidità e pertanto verrà lasciato riposare per un giorno, al fine di ottenere una netta separazione delle due fasi. Il terreno una volta completamente reidratato, mostrerà una separazione delle fasi e quindi

possiamo calcolare la WHC (2) basandoci sui ml di acqua in eccesso visibili nel cilindro graduato.

(2) $WHC = \text{totale acqua aggiunta (ml)} - \text{totale acqua eccesso (ml)}$

In base al risultato ottenuto, sarà possibile utilizzare tale dato, per calcolare a diversa quantità di terreno, la WHC del medesimo, tramite una semplice proporzione.



Figura 14- Metodo della WHC

I campioni di acqua superficiale sono stati conservati al buio a una temperatura di 4 °C. Prima di svolgere i saggi sui microrganismi acquatici, i campioni sono stati filtrati. Il campione è stato utilizzato in forma tal quale e in caso di necessità sono state effettuate opportune diluizioni aggiungendo acqua standard.

3.3. Organismi usati nei saggi

Gli organismi utilizzati nei saggi ecotossicologici sono selezionati per la loro sensibilità agli inquinanti e la loro rappresentatività degli ecosistemi naturali.

Per ottenere un quadro degli effetti sugli ecosistemi, si agisce effettuando saggi su organismi rappresentativi dei principali anelli delle catene trofiche: (libro ecotossicologia)

- **Produttori primari:** questo gruppo include alghe e piante, organismi fondamentali che convertono l'energia solare in biomassa attraverso la fotosintesi.

- Consumatori primari: abbiamo ad esempio i microcrostacei (*Daphnia magna*), che sono organismi erbivori che si nutrono di piante e alghe. Essi rappresentano il primo livello dei consumatori nella catena alimentare e sono essenziali per trasferire l'energia agli anelli trofici superiori.
- Decompositori: questo gruppo comprende organismi come i lombrichi e i batteri, che svolgono un ruolo cruciale nel ciclo dei nutrienti decomponendo la materia organica morta in composti utilizzabili dalle piante.

Gli organismi trattati nei saggi di questo progetto sono i seguenti:

- 1) Il sorgo e il crescione sono utilizzati nel saggio di germinazione e allungamento radicale. Questo saggio di fitotossicità, della durata di 72 ore, valuta la potenziale tossicità del suolo stimando l'inibizione della germinazione e dell'allungamento radicale dei semi a contatto con il campione, confrontandoli con controlli privi di contaminanti.
- 2) I lombrichi della specie *Eisenia andrei* vengono utilizzati in un saggio di tossicità terrestre. I lombrichi adulti sono introdotti in questo ambiente e, dopo un'esposizione di 4 settimane, si valutano la mortalità (effetto acuto) e gli effetti sulla loro crescita (effetto cronico) rispetto a un controllo.
- 3) Le *Daphnia magna* vengono usate in un saggio acuto della durata di 24 o 48 ore allo scopo di valutare la percentuale di immobilizzazione rispetto al controllo. Gli organismi utilizzati sono giovani nati da femmine partenogenetiche entro 24 ore dall'inizio del saggio.
- 4) La *Raphidocelis subcapitata* è un'alga verde monocellulare che viene utilizzata nel saggio di inibizione della crescita per valutare gli effetti tossici di sostanze chimiche. Questo saggio, della durata di 72 ore, ha lo scopo di stimare l'inibizione della crescita delle alghe rispetto a un controllo, misurando la densità cellulare come indicatore di crescita.
- 5) Il *Vibrio fischeri* è un batterio marino con proprietà bioluminescenti. In questo saggio l'effetto da stimare è la riduzione della bioluminescenza, rilevata con un luminometro, dopo 15 e 30 minuti di esposizione.

3.4. SAGGI DI TOSSICITÀ TERRESTRE

3.4.1. Saggio di fitotossicità sul sorgo e sul crescione

Il saggio di germinazione e allungamento radicale, noto anche come Fitotest, è un saggio di fitotossicità eseguito sul suolo, regolato dalla normativa UNI 11357:2010⁴⁹. Questo saggio permette di valutare la potenziale tossicità di un campione di suolo misurando l'inibizione della germinazione e/o dell'allungamento radicale dei semi posti a contatto con il campione, confrontandoli con controlli specifici che non contengono sostanze contaminanti.

MATERIALI UTILIZZATI:

- Filtri in carta Whatman® qualitative filter paper Grade 1 - 90 mm diametro (n°1001090) (SIGMA ALDRICH Z240079)
- Piastre Petri sterili in polistirene 100x15 monouso (BD FALCON 351029)
- Suolo campione o suolo standard OECD
- Pipette sierologiche
- Righello millimetrato
- Pinzette
- Incubatore termostato 25±2°C
- Acqua Milli Q
- Becher
- Parafilm

SEMI DEGLI ORGANISMI MODELLO (figura 15):

- Semi di *Lepidium sativum* L. (Crescione)
- Semi di *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo)

⁴⁹ UNI 11357:2010 UNI 11357:2010

Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo) - Saggio di tossicità cronica breve



Figura 15-Semi di sorgo e crescita

Per il saggio, sono stati prelevati 20 g di campione da analizzare e sono state allestite 4 repliche per ogni organismo modello in piastre Petri sterili in polistirene, identificate con sigle per differenziarne il contenuto. In tre piastre sono stati inseriti semi di *Lepidium sativum* L. (crescione) e in altre 4 piastre semi di *Sorghum saccharatum* Moench (sorgo). Sono state inoltre preparate 4 repliche di controllo per ogni seme, utilizzando come terreno di coltura un terreno artificiale OECD.

Prima del posizionamento dei semi, i campioni sono stati inumiditi con la quantità di WHC rilevata precedentemente, mentre il terreno OECD ha una WHC di 9 ml di acqua Milli-Q per circa 20 g. Su ogni terreno è stato poi posizionato un filtro di carta, anch'esso inumidito con 1 ml di acqua Milli-Q. Successivamente, per ciascuna piastra sono stati posizionati 10 semi per ogni varietà. I semi sono stati disposti secondo lo stesso schema, con la differenza che il seme di sorgo, essendo più grande di quello del crescione, deve essere posizionato con un lato specifico a contatto con il filtro.

Le piastre Petri sono state chiuse, avvolte con parafilm per facilitarne l'impilaggio e ridurre l'evaporazione; quindi, posizionate in incubatore al buio a una temperatura di $25 \pm 2^\circ\text{C}$ per 72 ore, senza mischiare le specie. Al termine della prova, per ciascuna replica e per ciascun campione è stato contato il numero di semi germinati e misurata la lunghezza radicale di ciascun seme, come mostrato in figura 16.

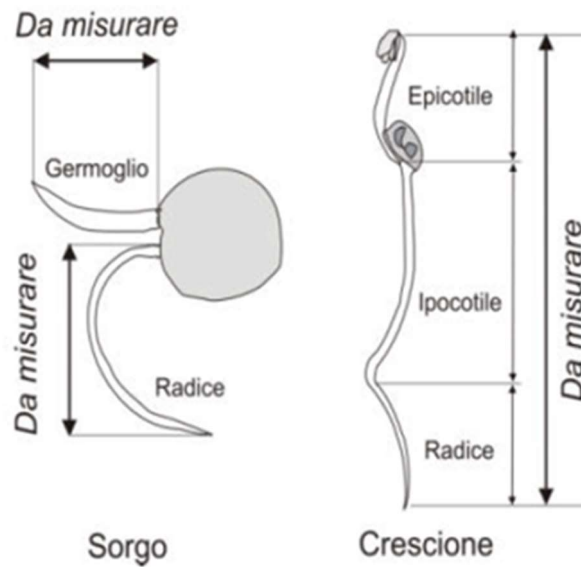


Figura 16- Rappresentazione relativa alla misurazione della lunghezza radicale dei semi di Sorgho e di Crescione.

L'effetto della matrice sulla germinazione e sulla crescita delle radici viene misurato combinando entrambe le risposte nell'Indice di Germinazione Percentuale (IG%).

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

L'indice di geminazione è dato dal prodotto tra la media dei semi germinati e la media della lunghezza delle radici $IG = (L * n)$ dove "L" rappresenta la media della lunghezza radici, ed "n" il numero medio dei semi germinati.

Quando il saggio viene eseguito su una serie di concentrazioni della matrice da valutare per la fitotossicità, consente di stimare l' EC_{50} e, se necessario, anche i valori di LOEC e NOEC.⁵⁰

3.4.2. Saggio di tossicità su *E. andrei*

In questo saggio di laboratorio, dopo un'esposizione di 4 settimane, vengono valutati la mortalità e gli effetti sulla crescita dei lombrichi adulti. (OECD 222)⁵¹

50 Protocollo del saggio di fitotossicità sul sorgo e sul crescione rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

51 OECD (2016), *Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264496-en>.

MATERIALI UTILIZZATI:

- bilance in grado di pesare singoli lombrichi e suolo;
- misuratore di luce;
- pellicola trasparente
- pinzette
- contenitori di vetro
- componenti del terreno: torba, sabbia e terreno universale
- terreno campione
- carta assorbente
- farina di avena
- acqua deionizzata

Nel presente saggio di laboratorio, ogni contenitore di vetro è stato riempito con 500 g di terreno. Il controllo è stato composto da una miscela di 10% di torba, 10% di sabbia e 80% di terreno universale. Per il campione da testare, è stata utilizzata una composizione di 50% di terreno campione, 30% di terreno standard, 10% di torba e 10% di sabbia. Questa composizione ha permesso di valutare in modo accurato gli effetti del campione sugli organismi in esame. Il campione è stato aggiunto a un terreno universale e successivamente sono stati introdotti lombrichi adulti della specie *E. andrei*. I lombrichi utilizzati erano adulti, prelevati da un allevamento con età relativamente omogenea. Per ogni contenitore di controllo e trattamento sono stati preparati 10 lombrichi (3 repliche per campione). Prima dell'inizio del saggio, i lombrichi sono stati lavati, asciugati su carta assorbente per eliminare l'acqua in eccesso e pesati. I contenitori sono stati riempiti mescolando il campione da esaminare con il substrato di base, successivamente inumidendo il suolo con acqua deionizzata al 40-60% della massima capacità idrica. I lombrichi pesati sono stati posti sulla superficie del suolo. I lombrichi in buono stato di salute si interrano subito sotto la superficie del substrato; quelli che rimangono in superficie dopo 15 minuti devono essere sostituiti poiché potrebbero essere danneggiati. I nuovi lombrichi sostituiti devono essere pesati per aggiornare il peso totale iniziale del contenitore. I contenitori sono stati coperti con

pellicola di plastica trasparente per garantire l'accesso della luce ed evitare la fuga dei lombrichi, e poi posti nella camera adibita al saggio (figura 17). La temperatura del saggio è stata mantenuta a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con cicli di luce/buio controllati (preferibilmente 16 ore di luce e 8 di buio). I contenitori non sono stati aerati durante il saggio, ma sono stati aperti due volte alla settimana per nutrire gli organismi e mantenere costante il contenuto idrico, permettendo così gli scambi gassosi. Come nutrimento, è stata somministrata una volta alla settimana farina di avena, interrata per evitare la formazione di muffe. Dopo 4 settimane di esposizione, sono stati determinati la mortalità e gli effetti sulla crescita dei lombrichi adulti. Tutti i lombrichi sono stati rimossi dai contenitori, contati e pesati. Questo saggio analizza sia gli effetti acuti, dati dalla mortalità osservata dopo 28 giorni, sia gli effetti cronici, dati dalla differenza di peso tra il t0 e il t28 (effetti sulla crescita). Se si osserva una diminuzione percentuale della crescita degli organismi nei campioni rispetto al controllo, è possibile stimare l'EC₅₀.

3.5. SAGGI DI TOSSICITÀ ACQUATICA

3.5.1. Saggio di immobilizzazione acuta su *Daphnia magna*

Il saggio con *D. magna* consiste nell'esposizione di un numero di organismi neonati al campione allo scopo di stimare l'inibizione della mobilità. (OECD 202, 2004).⁵²

L'endpoint che andiamo ad osservare è la sopravvivenza dei daphnidi dopo 48 ore di esposizione, e può anche essere stimato l'EC (Effect Concentration) sul 50% degli organismi trattati.

MATERIALI UTILIZZATI:

- DAPHTOXKIT (MicroBioTest, ECOTOX)
- Bechers di 25 e 100 ml
- Acqua distillata
- Pipette Pasteur
- Cilindro graduato
- Lavagna Luminosa

⁵² OECD (2004), *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.

- Bicromato di Potassio

Fase della preparazione dell'acqua standard

Una parte molto importante della procedura è la preparazione dell'acqua standard, conosciuta anche come Standard Fresh Water. Questa soluzione è essenziale per garantire l'accuratezza dei saggi secondo le specifiche della ISO 6341. La preparazione dell'acqua standard prevede l'utilizzo di due serie di quattro fiale contenenti soluzioni concentrate di sali. Le fiale vengono aperte e il loro contenuto versato in un matraccio da 2 litri. Successivamente, la soluzione viene diluita con acqua distillata fino a raggiungere il volume totale di 2 litri. È essenziale conservare la soluzione ottenuta a una temperatura di 4°C, mantenendola al buio per preservarne la stabilità. Prima dell'utilizzo, l'acqua standard deve essere riportata a temperatura ambiente e aerata per almeno 15 minuti. Questo processo di aerazione può essere ottenuto insufflando aria nel contenitore.

Messa a dimora degli Efippi

Gli efippi sono dei gusci protettivi per le uova delle Daphnia, permettendo loro di sopravvivere anche in ambienti sfavorevoli. Il processo inizia con l'estrazione delle fiale contenenti gli efippi dal frigorifero. Ogni fiala ne contiene circa 400. Tramite una pipetta Pasteur, si aggiunge aria e acqua alle fiale per trasferire completamente le uova nel micro-setaccio. Successivamente, vengono sciacquati con acqua deionizzata per eliminare il liquido di conservazione e quindi trasferiti nelle piastre Petri riempite di acqua standard aerata (15 ml). Le piastre Petri contenenti gli efippi vengono quindi poste in incubazione a una temperatura di 20-22°C e con una luce di circa 6000 lux. Si attende la schiusa, un processo che richiede circa 80 ore dall'inizio dell'incubazione e durante questo periodo, è essenziale mantenere costanti le condizioni per garantire il successo del processo. Infine, la raccolta dei neonati deve avvenire entro le 90 ore dall'inizio dell'incubazione. Questi passaggi devono essere seguiti attentamente per garantire la validità e l'affidabilità dei risultati del saggio.

Conta dei neonati e pre-feeding

La sospensione di spirulina viene versata nella piastra di conta insieme ai neonati, che vengono lasciati alimentare per almeno due ore in vista delle fasi successive del saggio. Infine, si prepara una piastra Petri con acqua standard aerata e, utilizzando una pipetta

Pasteur, i neonati vengono trasferiti con delicatezza dalla capsula di schiusa alla piastra di conta, garantendo il numero corretto.

Preparazione del controllo positivo e delle soluzioni da saggiare

Per cominciare, il controllo positivo viene preparato utilizzando il Bicromato di Potassio, un composto noto e utilizzato come tossico di riferimento in molti studi di tossicità. Si prepara una soluzione madre di concentrazione 1 g/L di bicromato di potassio. I campioni che vogliamo esaminare sono le acque superficiali nella forma tal quale, ovvero senza alcuna alterazione o trattamento preliminare. Tuttavia, per condurre i saggi, effettueremo delle diluizioni (100%-75%-50%-25%-10%) utilizzando acqua standard precedentemente aerata.

Riempimento della piastra del saggio

La piastra del saggio è composta da sei serie da 5 pozzetti. (figura 18). Si inizia riempiendo i pozzetti con le soluzioni necessarie, partendo dalla concentrazione più bassa e utilizzando una sierologica avendo sempre in ogni pozzetto 10 ml di acqua. Nella serie X si inserisce acqua standard che fungerà da controllo, mentre dai pozzetti da 1 a 5 si aggiungono i campioni da analizzare

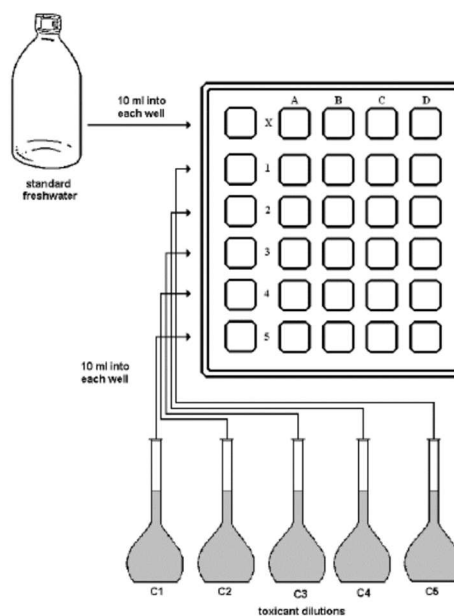


Figura 17- Immagine di un'ipotetica piastra presa dal protocollo dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

Trasferimento dei neonati

Dopo il periodo di pre-alimentazione di due ore, si procede con il trasferimento dei neonati dalla piastra di conta ai pozzetti della piastra. Quest'operazione richiede precisione nell'uso delle pipette Pasteur al fine di garantire la corretta manipolazione degli organismi e la continuità dell'esperimento. Per ogni trattamento sono necessari 20 neonati, distribuiti 5 per pozzetto. È fondamentale utilizzare pipette Pasteur diverse per ciascun trattamento al fine di evitare la contaminazione incrociata tra i campioni, preservando così l'integrità dei risultati. Durante le manipolazioni, è consigliabile utilizzare una lavagnetta luminosa o lavorare su uno sfondo scuro. Questi strumenti ottimizzano la visibilità dei neonati e facilitano il processo di trasferimento e conteggio.

Scoring dei risultati

Gli endpoints sono stati osservati dopo 48 ore. Abbiamo estratto la piastra dall'incubatore e l'abbiamo posizionata sopra la lavagnetta luminosa. Successivamente, abbiamo segnato su un foglio il numero di organismi morti o immobilizzati in ciascun pozzetto (esemplari che non nuotano entro 15 secondi dopo una leggera agitazione del liquido). Abbiamo poi calcolato il numero totale di organismi immobili o morti per ogni trattamento e la percentuale di effetto relativa rispetto al controllo.

Per calcolare la percentuale di effetto (% Effect), abbiamo utilizzato la seguente formula (3):

$$(3) \%EFFECT = \frac{daphnieimmobili}{daphnietotusateperiltrattamento} * 100$$

Per fare in modo che il saggio sia ritenuto valido, il numero totale di organismi immobili o morti nel controllo deve essere inferiore al 10%.⁵³

3.5.2. Saggio di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata*

Il saggio di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata* è un metodo utilizzato per valutare gli effetti tossici di sostanze chimiche sulla crescita di alghe verdi

⁵³ Protocollo del saggio di immobilizzazione acuta su *Daphnia magna* rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

monocellulari. Il principio di base è l'inibizione della crescita di queste alghe rispetto a un controllo, misurando la densità cellulare come indicatore di crescita. Il saggio di tossicità algale a 72 ore è standardizzato dalla linea guida OECD 201⁵⁴ e dalla ISO 8692:2012⁵⁵.

ORGANISMI UTILIZZATI:

- *Raphidocelis subcapitata*

REAGENTI UTILIZZATI:

- Cyanobacteria BG-11(50X, liquid, plant cell culture tested SIGMA)
- Acqua MilliQ
- ISO alga freshwater
- Soluzioni di Sali per saggio algale (kit ECOTOX)

STRUMENTAZIONE UTILIZZATA:

- Incubatore termostato 25±2°C
- TC20 Automatic Counter Bio-Rad
- Flask T25/T75
- Piastre 24-well
- Sierologiche
- Puntali
- Becher 50-100 ml
- Apparat di filtrazioni sterili (0.22 µm)
- Vetrini contacellule per TC20

54 OECD (2011), *Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>.

55 UNI EN ISO 8692:2012

Qualita' dell'acqua - Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi

- Pipette Pasteur

Preparazione del BG-11

Il medium BG-11 (50X come indicato sull'etichetta della falcon) deve essere preparato sotto cappa sterile, diluendo le soluzioni stock in un volume adeguato di acqua sterile. Il medium deve essere conservato a 4°C per un periodo massimo di 2 settimane.

Scongelo

Le aliquote crioconservate di alghe (1 milione/vial o superiori) devono essere scongelate e coltivate per almeno 10 giorni prima dell'esecuzione del saggio, provvedendo al mantenimento (split e aggiunta medium) ogni 3 giorni. Per scongelare le aliquote, accendere il bagnetto e impostarlo a 25°C e immergere l'ampolla affinché il materiale congelato sia sotto il livello dell'acqua. Aspettare lo scongelamento, agitando delicatamente. Immediatamente dopo lo scongelamento, trasferire asetticamente il contenuto del criovial in un tubo da 15 ml contenente 10 ml di BG-11. Centrifugare a 700-800 giri per 5 minuti, rimuovere il surnatante e risospendere con BG-11 fresco. Prelevare asetticamente il volume desiderato e distribuirlo all'interno delle flask T25/T75 con tappo filtrante (vented). Aggiungere BG-11 e incubare.

Propagazione e mantenimento:

Le flask contenenti le alghe devono essere collocate verticalmente all'interno di un incubatore termostato a 25 ± 1 °C, posizionate in corrispondenza dei segni verdi presenti sui ripiani dell'incubatore per garantire l'illuminazione adeguata alla crescita (ATCC consiglia un ciclo luce/buio di 14:10). Prima di utilizzarle per il saggio di tossicità, è fondamentale coltivare le alghe per almeno 10 giorni. Durante questo periodo, è necessario aggiungere BG-11 fresco ogni 3/4 giorni per favorire la crescita esponenziale della coltura, condizione essenziale per il corretto svolgimento del saggio.

Preparazione dei trattamenti

Mezz'ora prima del saggio, è fondamentale condizionare la soluzione ISO Freshwater a temperatura ambiente e aerarla utilizzando un generatore d'aria e un tubo poroso,

sigillando il contenitore con del parafilm. Successivamente, si pesa il trattamento e lo si dispone nel tubo per creare la soluzione di lavoro (WORKING SOLUTION). Si aggiunge la quantità necessaria di ISO Freshwater aerata per raggiungere la concentrazione richiesta e si miscela accuratamente.

Successivamente, si prende una piastra a 24 pozzetti e si segnano sul coperchio le corrispondenze con i trattamenti, facendo attenzione a non scrivere sopra l'area del pozzetto per evitare di alterare il passaggio della luce (figura 19). Si riempiono i pozzetti destinati al controllo con 2 ml di ISO Freshwater, posizionandone uno per riga in posizioni diverse. Si riempie poi con 2 ml di WORKING SOLUTION il pozzetto con la concentrazione più alta. Si calcolano i rapporti di diluizione necessari per ottenere le diverse concentrazioni da testare e si dispongono i volumi di trattamento all'interno dei pozzetti, portando successivamente ogni pozzetto a un volume totale di 2 ml con ISO Freshwater. La preparazione della piastra è stata svolta sotto cappa sterile.

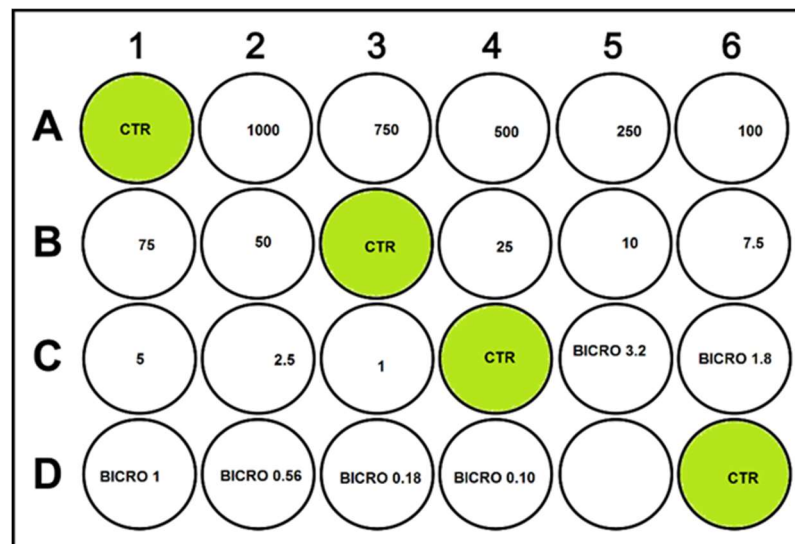


Figura 18- Esempio di disposizione dei pozzetti nella piastra

Preparazione dell'inoculo algale ed aggiunta:

Per iniziare la procedura, prelevare la flask contenente le alghe in coltura e aprirla delicatamente. Dopo aver risospeso il contenuto, prelevare un'aliquota di alghe. Per misurare la concentrazione algale, prelevare con una pipetta 20 μ L della sospensione e trasferirli su un vetrino di conta, effettuando due letture per ciascun vetrino. Utilizzando il contatore di cellule (TC20) e selezionando il gate di dimensioni comprese tra 4 e 10 μ m, inserire quindi il vetrino nel dispositivo. Dopo aver registrato il conteggio

ottenuto, ripetere i passaggi con la seconda camera del vetrino. A questo punto, è necessario calcolare la densità media della soluzione basandosi sulle letture effettuate. Successivamente, determinare il Rapporto di Diluizione (RDD) dividendo la densità media per $1,01E6$. Il protocollo richiede che i saggi vengano eseguiti con un'alga in concentrazione pari a 10.000 cellule/ml ($10 \text{ cells}/\mu\text{L}$).

Successivamente, prepariamo questa sospensione diluendo il volume di inoculo con ISO freshwater. Aggiungiamo un volume di pari alla differenza tra il volume desiderato e il volume di inoculo. Questo ci permette di ottenere una soluzione di inoculo a una concentrazione di $1,01E6$ cellule/mL. Infine, verifichiamo la concentrazione della soluzione di inoculo con il contatore di cellule TC20. Per garantire che l'inoculo abbia una concentrazione adeguata, dobbiamo prima determinare la concentrazione reale di cellule nell'inoculo. Questo valore dovrebbe essere intorno a $1E6$ cellule/mL. È importante che la densità cellulare sia nell'intervallo ottimale compreso tra $9E5$ e $1,1E6$ cellule/mL, secondo gli standard ISO. Se la densità supera $1,2E6$ cellule/mL, sarà necessario preparare una nuova diluizione. Una volta verificata e corretta la concentrazione dell'inoculo, estraiamo la piastra contenente i trattamenti dall'incubatore. Utilizzando una pipetta P20, trasferiamo con attenzione $20 \mu\text{L}$ di inoculo algale in ciascun pozzetto, evitando di toccare il trattamento con la punta della pipetta. Dopo aver aggiunto l'inoculo, chiudiamo accuratamente la piastra e la rimettiamo nell'incubatore per 72 ore a una temperatura di $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, mantenendo la luce accesa. Al termine del periodo di incubazione, procediamo alla misurazione della densità cellulare in ciascun pozzetto utilizzando il contatore di cellule TC20. I dati raccolti vengono inseriti in un foglio apposito, dove è anche riportata la concentrazione iniziale di alghe, calcolata dividendo la concentrazione dell'inoculo di passaggio 2N per 100.

Una volta estratta la piastra, iniziamo selezionando un pozzetto e omogenizzando la sospensione algale mediante aspirazione e rilascio con una pipetta Pasteur. Questo processo assicura una distribuzione uniforme delle cellule, permettendo una lettura rappresentativa. È consigliabile iniziare con i controlli e poi procedere con i trattamenti, seguendo un ordine decrescente di concentrazione. Questa sequenza previene sovrastime dovute al trasferimento di soluzioni concentrate tra i pozzetti. È importante cambiare il Pasteur per ogni campione per evitare contaminazioni incrociate.

Successivamente, trasferiamo 20 µL della sospensione nei vetrini del contatore di cellule TC20 e procediamo con le misurazioni. Una volta completata la lettura di tutta la piastra, elaboriamo i dati raccolti. Utilizziamo un foglio di calcolo per calcolare il tasso di crescita o Growth Rate (μ).

Successivamente, inseriamo le densità cellulari percentuali (rispetto al controllo) in software statistici come PRISM per determinare le curve di crescita, eseguire la regressione lineare per calcolare l'IC₅₀ e condurre analisi statistiche per identificare la NOAEC e i livelli di significatività. Questo approccio metodico ci consente di analizzare in modo completo e accurato gli effetti dei trattamenti sull'alga e di ottenere risultati significativi per la valutazione della tossicità.⁵⁶

3.5.3. Saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri*

Le acque superficiali prelevate sono state impiegate per valutare il loro impatto sul *Vibrio fischeri*, un batterio luminescente comune negli ecosistemi marini globali. Il saggio di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri* è stato condotto seguendo gli standard ISO 11348-3 (2007).⁵⁷ Il metodo consente la verifica della tossicità di campioni acquosi, esprimendo i risultati come inibizione percentuale (I%) e/o come concentrazione in grado di indurre un'inibizione della bioluminescenza sul 50% dei batteri (EC₅₀). (APAT 2004)⁵⁸.

ORGANISMI UTILIZZATI

- Batteri *Vibrio Fischeri*

MATERIALI E REAGENTI

- Luminometro Microtox® Model 500 (figura 20)

⁵⁶ Protocollo del saggio di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata* rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

⁵⁷ UNI EN ISO 11348-3:2019

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

⁵⁸ APAT 2004

https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/APAT_Guida_tecnica_indicatori_2004.pdf

- Cuvette di vetro
- Bechers da 25 e 100 ml
- Micropipette
- Soluzione ricostituente
- Osmotic Adjusting Solution
- Diluent
- Acqua Milli Q

Si è utilizzato il software Moder Water Microtox Omni 4.2. Si è dovuto impostare i parametri inerenti al numero dei controlli, dei campioni, delle corrispettive repliche e dei tempi di lettura per analizzare le cuvette (15 e 30 minuti). In questo caso il programma è 81,9% SCREENING TEST.

Ricostituzione dei batteri:

Si deve aggiungere 1 ml di soluzione di riattivazione nel pozzetto apposito, mantenendo una temperatura di 5,5 °C per 15 minuti. Dopodiché, si prende una boccetta di reattivo dal congelatore e gli si versa dentro la soluzione di riattivazione da 1 ml dalla cuvetta, agitare la boccetta con un movimento rotatorio per 30 secondi, quindi trasferire il contenuto nella cuvetta senza l'uso di pipette. Lasciare la cuvetta nel pozzetto di riattivazione per 30-40 minuti. I batteri riattivati saranno utilizzabili per circa 4 ore.

Preparazione della soluzione figlia: Il Diluent va acclimatato nel pozzetto F5 per 5 minuti. Successivamente, la sospensione madre viene mescolata con un volume di Diluent pari alla metà del quantitativo iniziale, effettuando 10-15 miscele. Si prelevano i batteri in un rapporto 1:10 con il Diluent e si lasciano a 15 °C nel pozzetto F5 per 15 minuti. Per ottenere 1 ml di soluzione figlia, si utilizzano 100 µl di batteri e 900 µl di Diluent.

Preparazione dei campioni: Si dispone un quantitativo di campione nelle cuvette preparative in eccesso rispetto al volume di utilizzo., aggiungendo il 2% di NaCl per i campioni di acqua dolce. Questa operazione deve essere completata prima dello scadere dei 15 minuti di preparazione della soluzione figlia. La soluzione figlia viene quindi mescolata con un volume di campione pari alla metà per circa 10 volte. Si prelevano aliquote di 100 µl della soluzione figlia e si inseriscono nelle cuvette di lettura, toccando il fondo con la pipetta, sollevandola leggermente e rilasciando il contenuto.

La prima cuvetta (CTRL) va inserita nel pozzetto di lettura e si preme "SET". Si preme "START" sulla schermata del PC e si legge la cuvetta premendo il tasto "READ" sullo strumento. Dunque inizialmente si fanno letture preliminari con solo la soluzione figlia di tutte le cuvette per misurare solo i batteri.

Successivamente si prelevano 900 µl di campione e si inseriscono in ogni replica pre-batterizzata avendo un totale di (1000 µl), iniziando dal CTRL e procedendo con una scala di concentrazione crescente. Il campione va inserito dall'alto, senza toccare, rilasciandolo con decisione. Una volta preparata la prima cuvetta, si preme "START" sulla schermata del PC. Allo scadere del timer (dopo 15 e 30 minuti), un segnale acustico indicherà di procedere alla rilettura di tutte le cuvette nello stesso ordine.⁵⁹

Quello che andremo a valutare è la vitalità batterica, che è direttamente proporzionale alla bioluminescenza emessa. Misureremo la differenza nella concentrazione dei batteri (rilevata come bioluminescenza) tra la misurazione iniziale (nella soluzione di controllo senza il campione) e quelle effettuate dopo 15 minuti e 30 minuti con i batteri nel campione da analizzare. Questa differenza verrà successivamente espressa in termini percentuali di effetto. Quando la percentuale di effetto supera il 20%, indica un effetto tossico del campione e richiede ulteriori approfondimenti adottando ulteriori diluizioni al fine di creare una curva dose-risposta dalla quale si può dedurre anche l'EC₅₀.

⁵⁹ Protocollo del saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri* rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

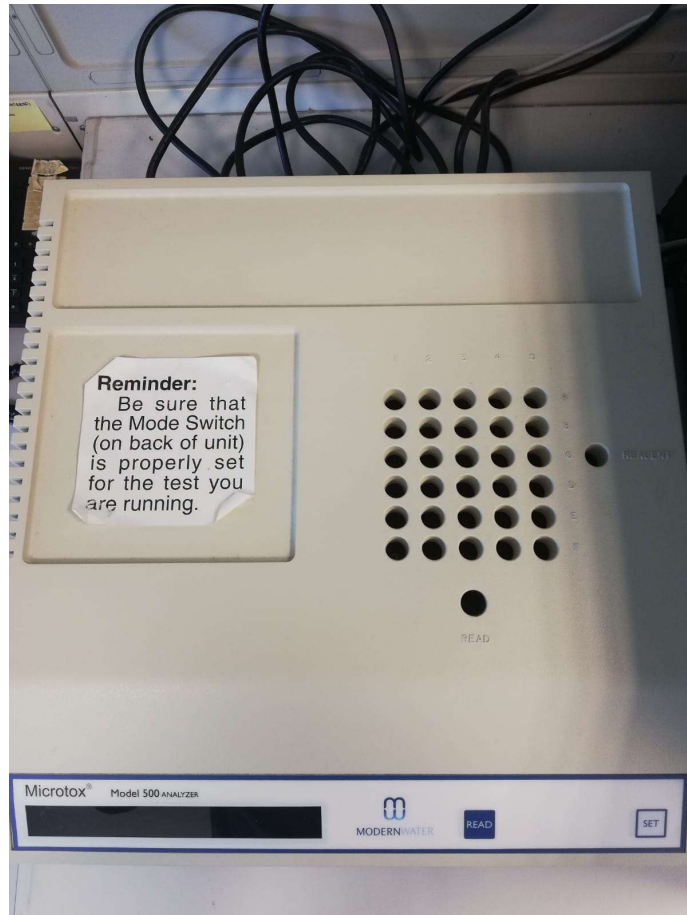


Figura 19- Luminometro Microtox® Model 500 usato per il saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri*

4. RISULTATI

4.1. Introduzione ai risultati

I saggi ecotossicologici terrestri sono stati svolti su 17 campioni di suolo mentre quelli acquatici su 7 campioni di acqua superficiale.

I risultati di questo studio sono stati presentati seguendo una suddivisione tra i saggi di tossicità terrestre e quelli di tossicità acquatica. Successivamente, sono stati ulteriormente suddivisi in base al tipo di saggio eseguito.

Per quanto riguarda la rappresentazione grafica dei risultati relativi ai saggi di tossicità terrestre, i siti sono stati raggruppati in gruppi da 4 a 5 in base alla vicinanza geografica, permettendo così di confrontare siti con caratteristiche simili di suolo e di pressioni antropiche.

Infine, per i grafici dei risultati dei saggi di tossicità acquatica, i 7 campioni di acqua superficiale sono stati visualizzati nello stesso grafico, ma con l'aggiunta di colori differenti per distinguere chiaramente i 3 campioni provenienti da Gerenzano dai 2 di Gorla Maggiore.

4.2. Risultati saggi tossicità terrestre

Saggi di fitotossicità sul sorgo e crescita

Questo saggio permette di valutare la potenziale tossicità di un campione di suolo misurando l'inibizione della germinazione e/o dell'allungamento radicale dei semi posti a contatto con il campione, confrontandoli con controlli specifici che non contengono sostanze contaminanti. Dalle analisi dei risultati dei nostri saggi è risultato che 16 campioni su 17 hanno mostrato % di IG (Indice di germinazione) vicini al 100% indicando l'assenza di potenziali effetti da inquinanti sui terreni trattati. Nel sito di Gorla Maggiore A. Volta è stato osservato invece un indice di germinazione di 64,09% rispetto al controllo e quindi questo potrebbe indicare un potenziale effetto.

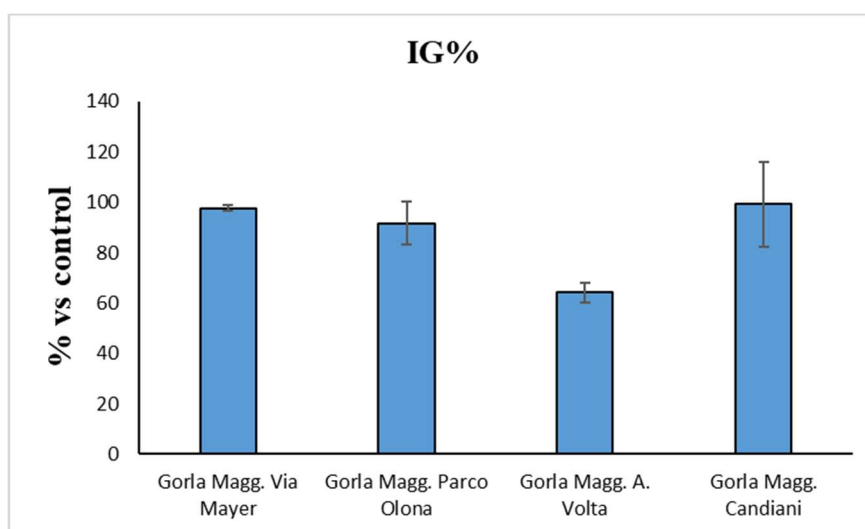


Figura 20 -Risultati del saggio di fitotossicità sul sorgo nei siti di Gorla Maggiore

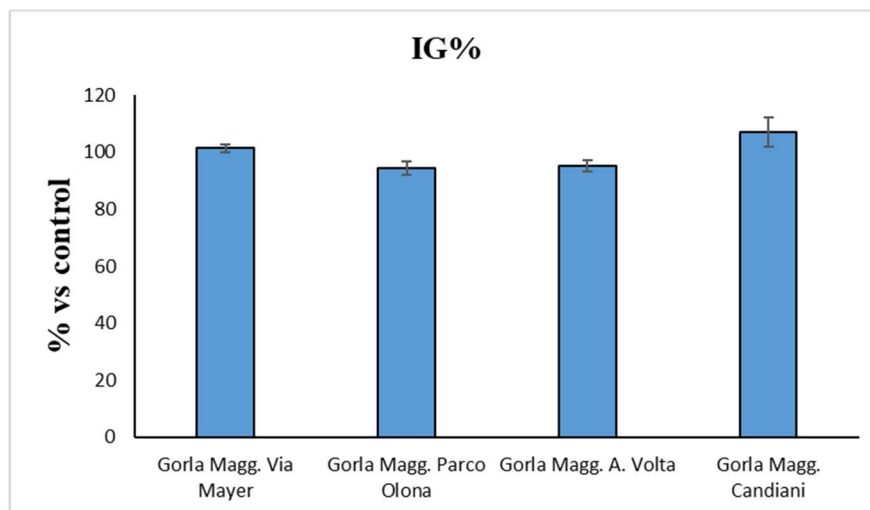


Figura 21 – Risultati del saggio di fitotossicità sul crescione nei siti di Gorla Maggiore

Come mostrato nei grafici nelle figure 20 e 21, sui terreni prelevati da Gorla Maggiore, si sono osservati effetti di tossicità solo nel saggio di fitotossicità sul sorgo del sito di A. Volta. Su tale sito sono in corso altri aggiornamenti che verranno forniti in studi futuri.

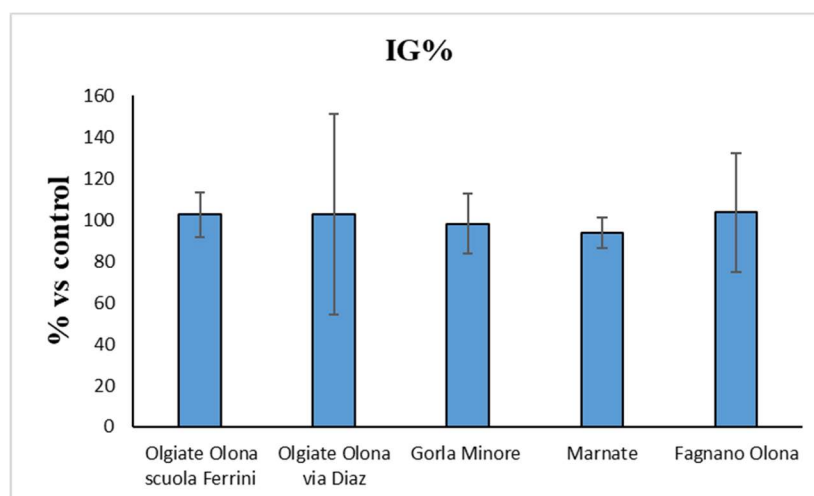


Figura 22- Risultati del saggio di fitotossicità sul sorgo nei siti di Olgiate Olona, Gorla Minore, Marnate e Fagnano Olona

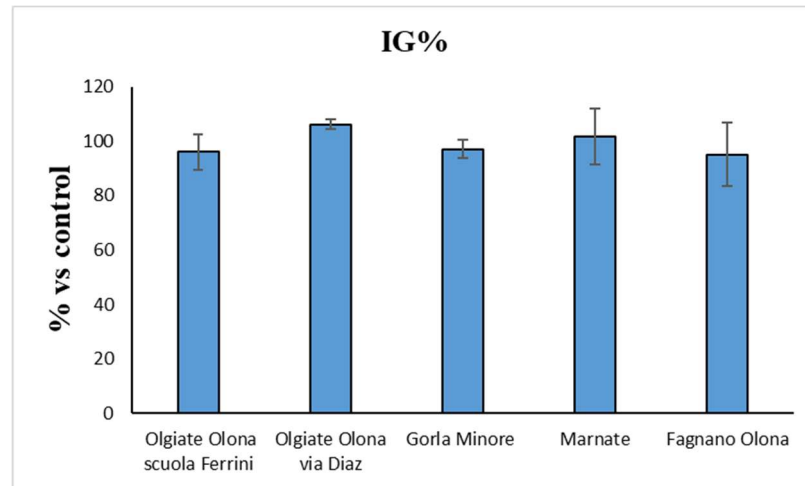


Figura 23 – Risultati del saggio di fitotossicità sul crescione nei siti di Olgiate Olona, Gorla Minore, Marnate e Fagnano Olona

Nei campioni raccolti dai siti di Olgiate Olona, Gorla Minore, Marnate e Fagnano Olona, sui quali sono stati condotti saggi di fitotossicità sul sorgo e sul crescione, i grafici in figura 22 e 23 non mostrano alcun effetto causato da inquinanti.

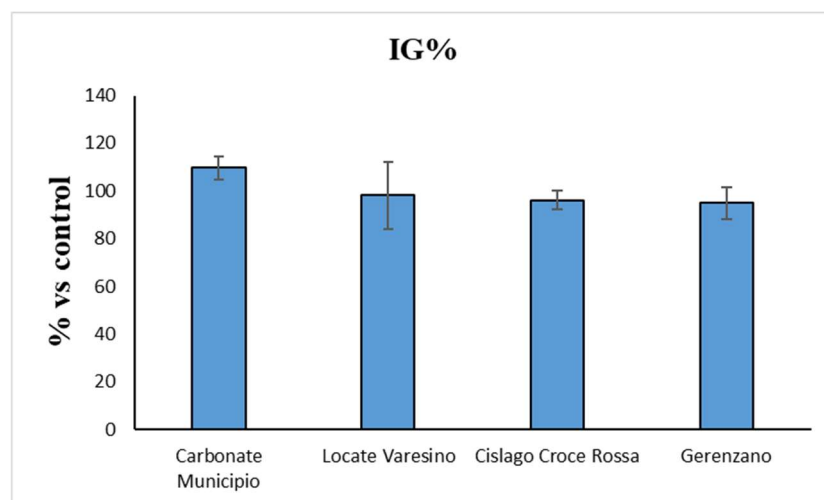


Figura 24- Risultati del saggio di fitotossicità sul sorgo nei siti di Carbonate, Locate Varesino, Cislago e Gerenzano

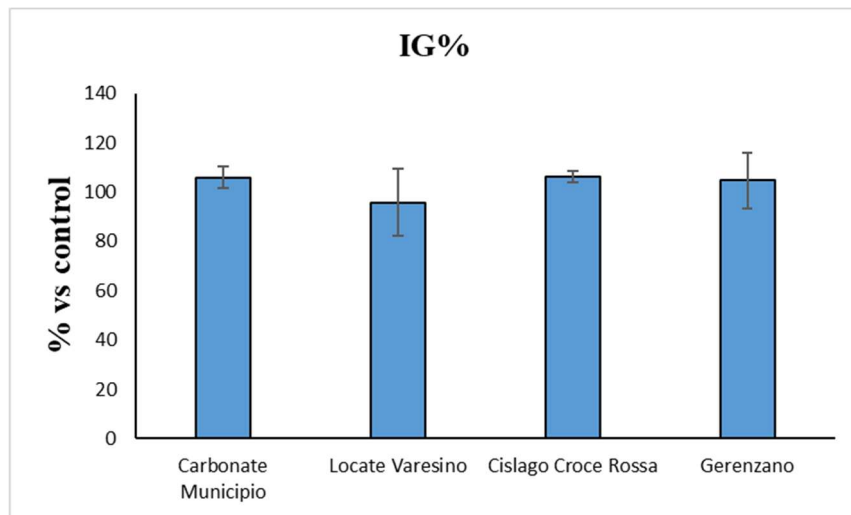


Figura 25 – Risultati del saggio di fitotossicità sul crescione nei siti di Carbonate, Locate Varesino, Cislago e Gerenzano

Nei grafici delle figure 24 e 25, nei campioni prelevati dai siti di Carbonate, Locate Varesino, Cislago e Gerenzano, non si evidenziano effetti inibenti da inquinanti sugli organismi trattati.

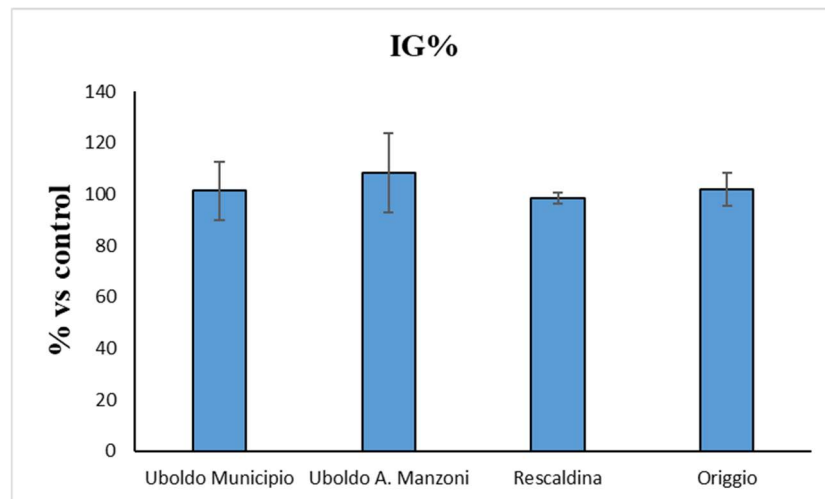


Figura 26 – Risultati del saggio di fitotossicità sul sorgo nei siti di Uboldo, Rescaldina ed Origgio

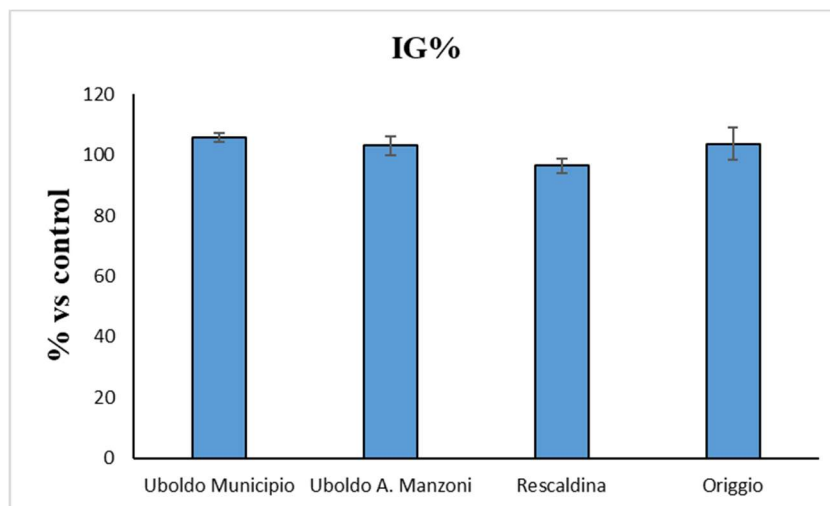


Figura 27– Risultati del saggio di tossicità sul crescione nei siti di Uboldo, Rescaldina ed Origgio

Nei grafici nelle figure 26 e 27, a seguito dei saggi di fitotossicità utilizzando il sorgo e il crescione svolti sui campioni di suolo prelevati dai siti di Uboldo, Rescaldina e Origgio, non si evidenziano effetti inibenti da inquinanti.

SAGGIO TOSSICITÀ SU E. ANDREI

Nei saggi ecotossicologici condotti su *E. andrei*, trenta vermi sono stati esposti al terreno di ciascun sito per un periodo di 28 giorni. È importante notare che tutti i vermi esposti sono rimasti vivi per tutta la durata del test. La percentuale di peso dei vermi esposti, rispetto al gruppo di controllo, si è attestata a circa il 100%. Questi risultati indicano la mancanza di effetti causati da inquinanti sugli organismi di *E. andrei* trattati.

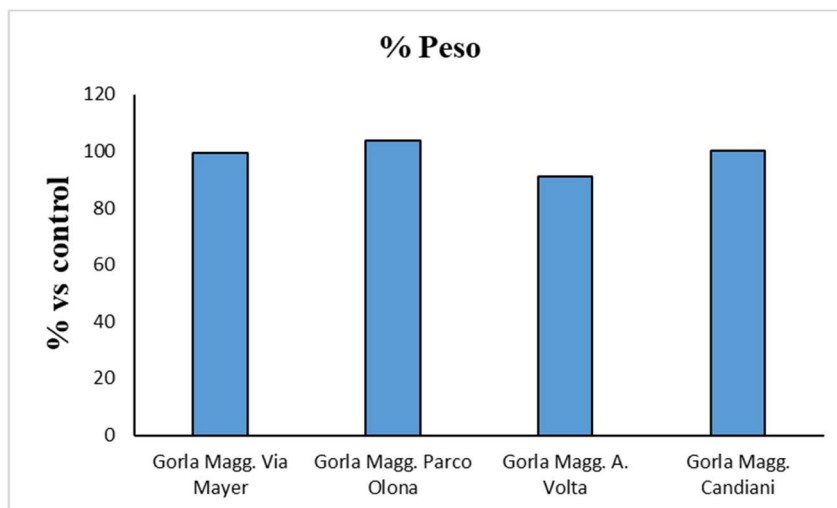


Figura 28 - Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di peso degli organismi nei siti di Gorla Maggiore rispetto al controllo

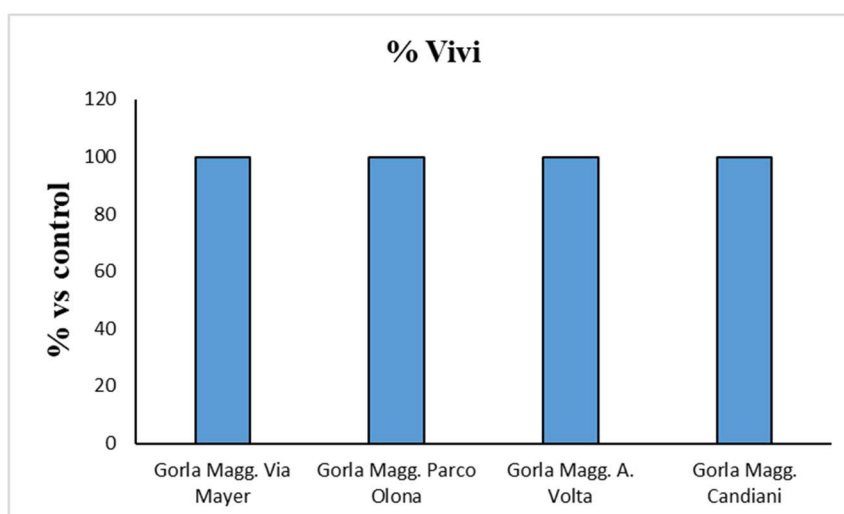


Figura 29 - Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di organismi vivi nei siti di Gorla Maggiore rispetto al controllo

Nei grafici nelle figure 28 e 29 nei siti di Gorla Maggiore, i campioni di suolo non mostrano effetti inibitori dovuti agli inquinanti, né per quanto riguarda la vitalità né per la percentuale di peso su *E. andrei* rispetto al controllo.

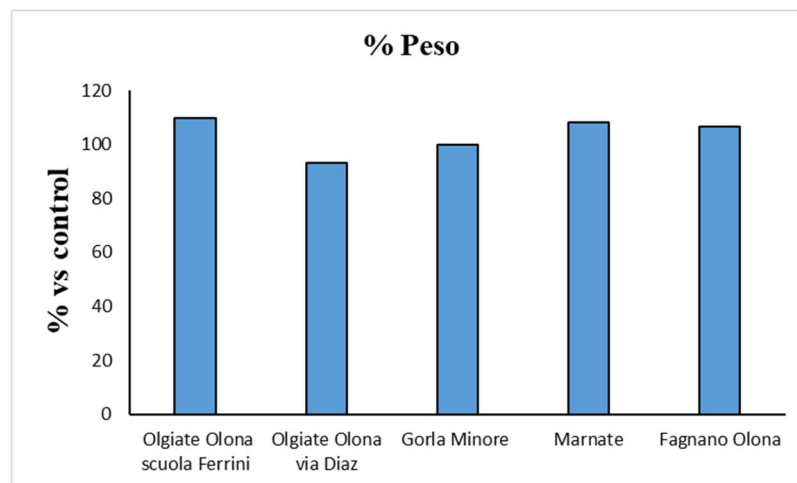


Figura 30 - Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di peso degli organismi nei siti di Olgiate Olona, Gorla Minore, Marnate e Fagnano Olona, rispetto al controllo

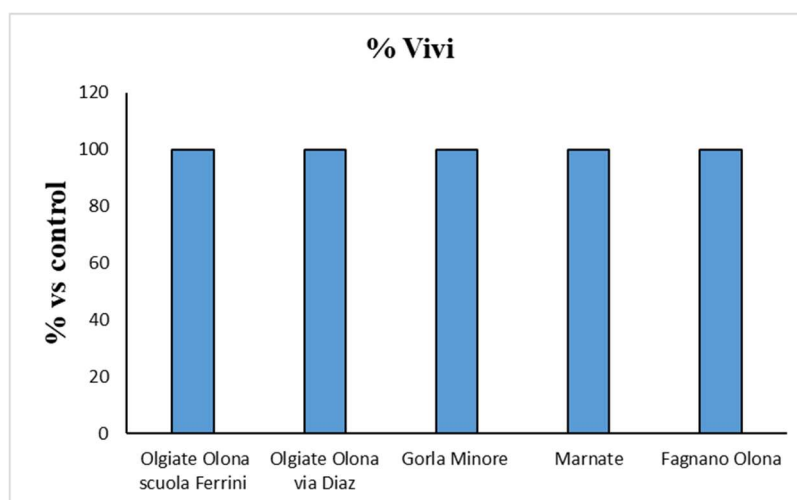


Figura 31- Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di organismi vivi nei siti di Olgiate Olona, Gorla Minore, Marnate e Fagnano Olona, rispetto al controllo

Nei siti di Olgiate Olona, Gorla Minore, Marnate e Fagnano Olona, i grafici delle figure 30 e 31 indicano che i campioni di suolo non presentano effetti inibitori dovuti agli inquinanti, sia in termini di vitalità che nella percentuale di peso su *E. andrei* rispetto al gruppo di controllo.

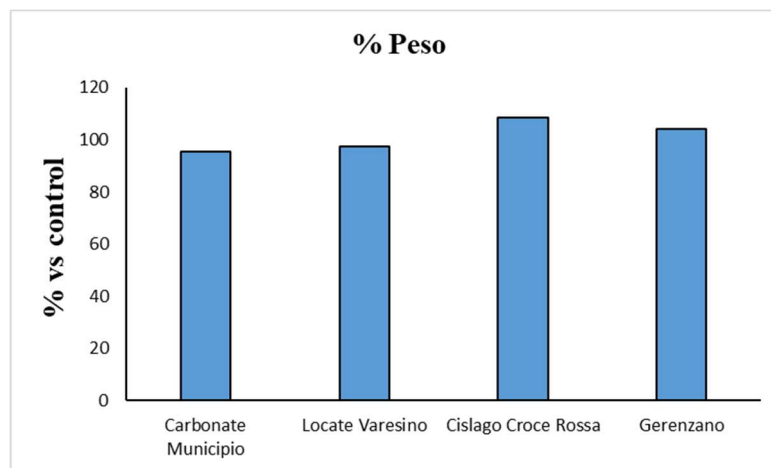


Figura 32 - Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di peso degli organismi nei siti di Carbonate, Locate Varesino, Cislago e Gerenzano rispetto al controllo

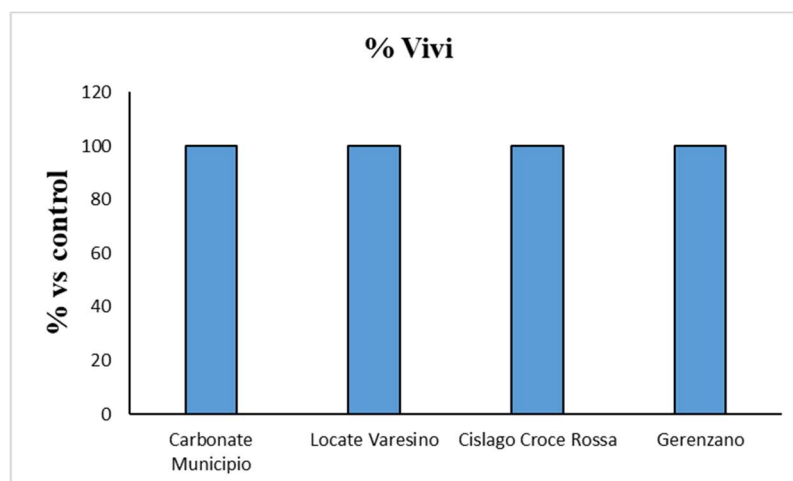


Figura 33- Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di organismi vivi nei siti di Carbonate, Locate Varesino, Cislago e Gerenzano rispetto al controllo

Nei siti di Carbonate, Locate Varesino, Cislago e Gerenzano, i grafici delle figure 32 e 33 mostrano che i campioni di suolo non hanno manifestato segni di inibizione causati dagli inquinanti, sia in termini di vitalità sia nella percentuale di peso su E. andrei rispetto al gruppo di controllo.

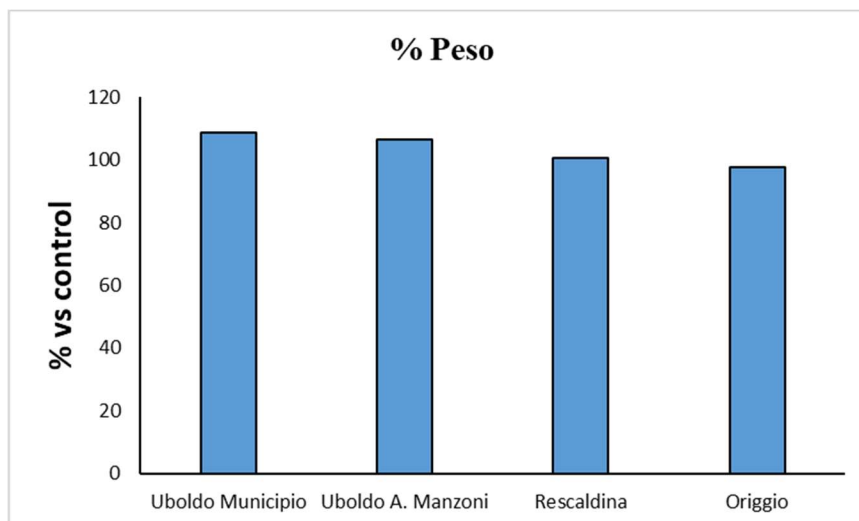


Figura 34- Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di peso degli organismi nei siti di Uboldo, Rescaldina ed Origgio rispetto al controllo

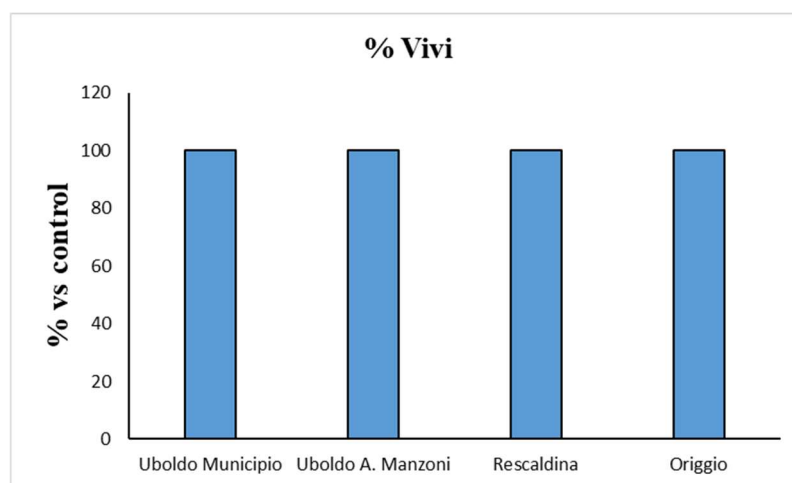


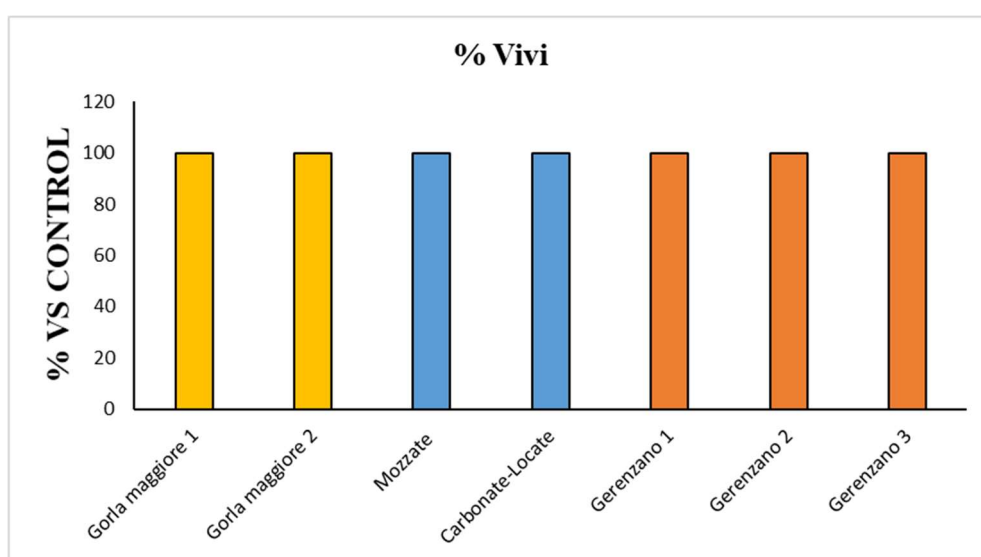
Figura 35- Risultati del saggio di tossicità su E. andrei che analizzano la % di organismi vivi nei siti di Uboldo, Rescaldina ed Origgio rispetto al controllo

Nei siti di Uboldo, Rescaldina ed Origgio, nei grafici delle figure 34 e 35, non sono stati osservati effetti inibitori nei campioni di suolo a causa degli inquinanti, né in termini di vitalità né nella percentuale di peso su *E. andrei* rispetto al gruppo di controllo.

4.3. Risultati saggi tossicità acquatica

- Saggio di immobilizzazione acuta su *daphnia magna*

In questo studio, la tossicità acquatica acuta è stata valutata utilizzando il saggio di immobilizzazione acuta di *Daphnia magna*. L'immobilizzazione dei dafnidi è stata registrata a 48 ore dopo l'esposizione. In questo saggio, i campioni di acqua superficiale sono stati testati tal quali e non hanno mostrato effetti di tossicità negli organismi trattati; pertanto, non sono state necessarie ulteriori diluizioni.



*Figura 36 – Risultati del saggio di immobilizzazione acuta su *Daphnia magna* che analizzano la % di organismi vivi nei siti di Gorla Maggiore, Mozzate, Carbonate-Locate e Gerenzano*

Dal grafico in figura 36 si è osservato una % di sopravvivenza di *Daphnia magna* pari al 100% rispetto al controllo e questo indica l'assenza di potenziali effetti tossici da parte di inquinanti nei campioni di acqua superficiale testati.

- Saggi di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri*

In questo studio, è stato svolto il saggio di inibizione della bioluminescenza allo scopo di valutare la % della vitalità dei batteri di *Vibrio fischeri* che è direttamente proporzionale alla bioluminescenza dopo 15 e 30 minuti dall'inizio del saggio. I campioni di acqua superficiale sono stati testati tal quali e non hanno mostrato effetti di tossicità negli organismi trattati e quindi non sono state necessarie diluizioni.

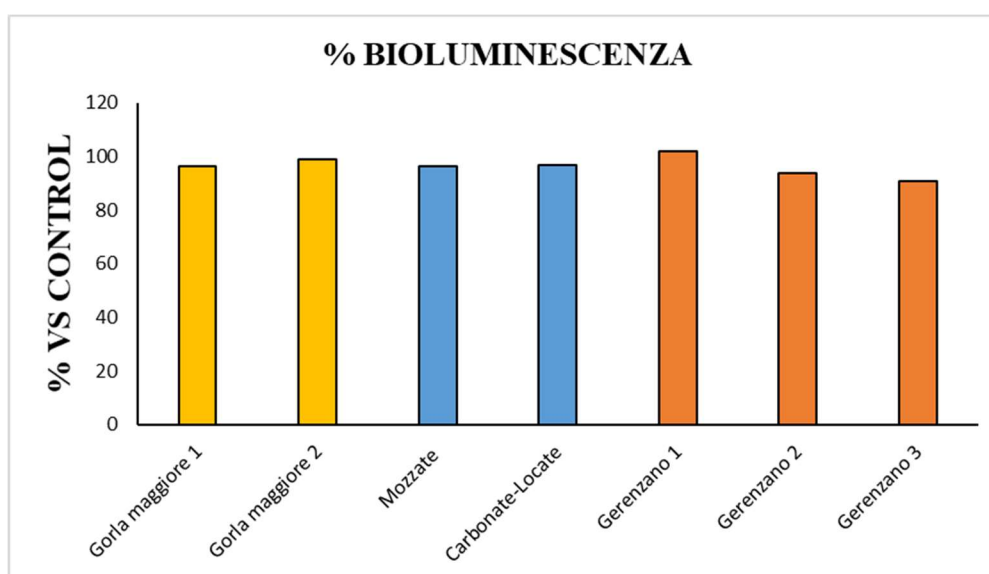


Figura 37 – Risultati del saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri* che analizzano la % di bioluminescenza nei siti di Gorla Maggiore, Mozzate, Carbonate-Locate e Gerenzano

Dal grafico in figura 37, nei saggi di inibizione della bioluminescenza condotti sul *Vibrio fischeri*, la percentuale di bioluminescenza è stata confrontata con quella del controllo. La bioluminescenza, simile al 100% rispetto al controllo, ci indica una mancanza di effetti tossici causati da inquinanti nei campioni di acqua superficiale analizzati.

- Saggi di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata*

Il saggio di inibizione della crescita algale sui campioni di acqua superficiale alla concentrazione del 100% ha mostrato effetti inibenti. Pertanto, è stato necessario eseguire ulteriori repliche con diluizioni per creare delle curve Dose-Risposta e stimare l'EC₅₀.

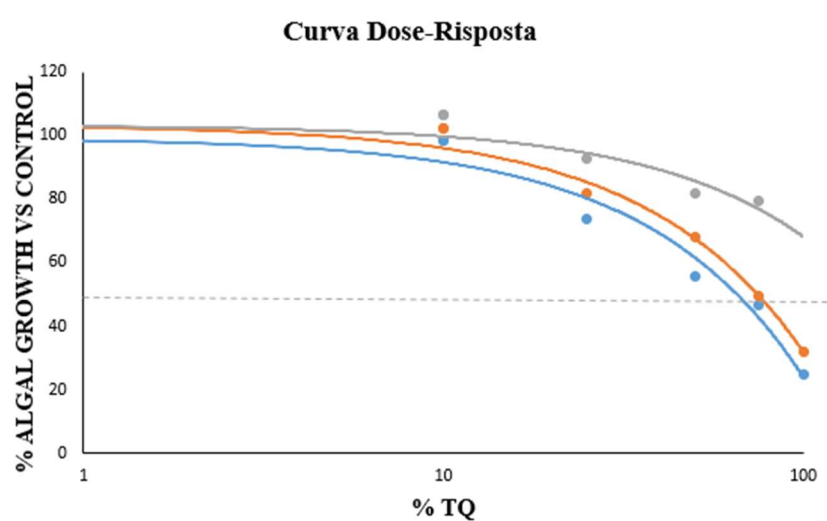


Figura 38 – Curva Dose – Risposta derivata dal saggio di inibizione della crescita algale sui campioni di Gerenzano

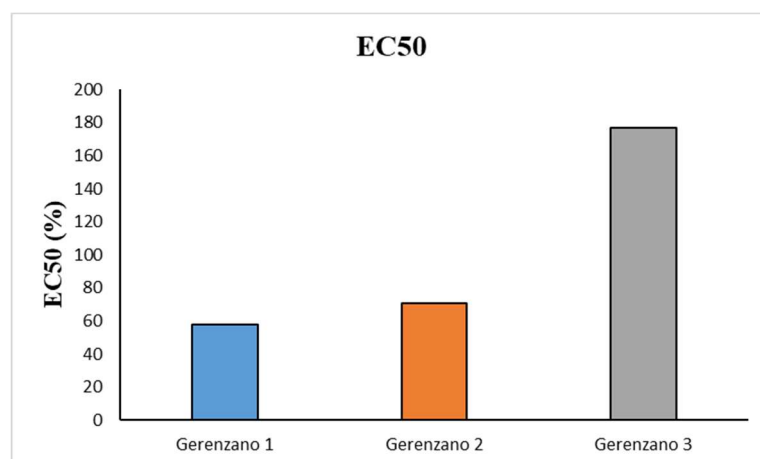


Figura 39 – Stima della EC₅₀ derivante dalla curva Dose- Risposta dal saggio di inibizione della crescita algale sui campioni di Gerenzano

Come mostrato nella Figura 38, le curve Dose-Risposta nei saggi di inibizione della crescita algale, evidenziano la presenza di un effetto inibente dei nostri campioni sulla crescita algale (dose-dipendente). In particolare, la Figura 39 mostra chiaramente che i campioni di Gerenzano 1 e Gerenzano 2 presentano valori di EC_{50} (Concentrazione Effetto sul 50% della popolazione) rispettivamente intorno al 57% e 70% della propria concentrazione rispetto al controllo, indicando così un effetto tossico.

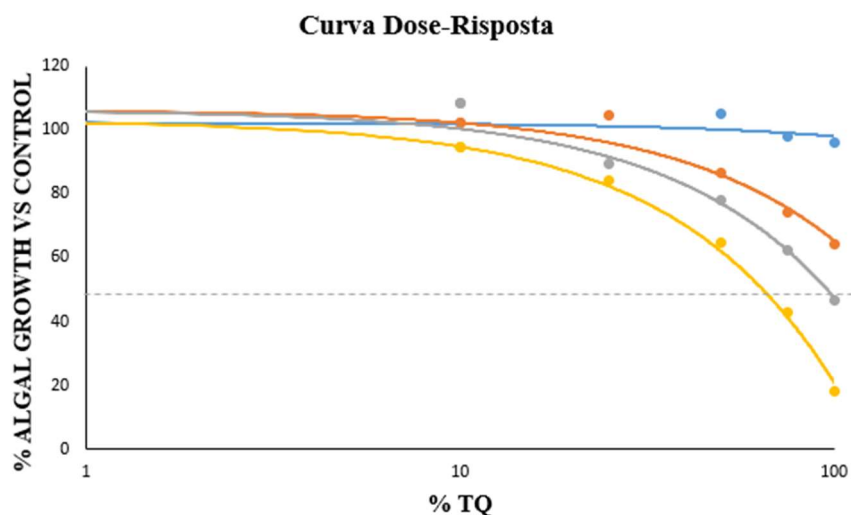


Figura 40 – Curva Dose – Risposta derivata dal saggio di inibizione della crescita algale sui campioni di Gorla Maggiore, Mozzate e Carbonate-Locate

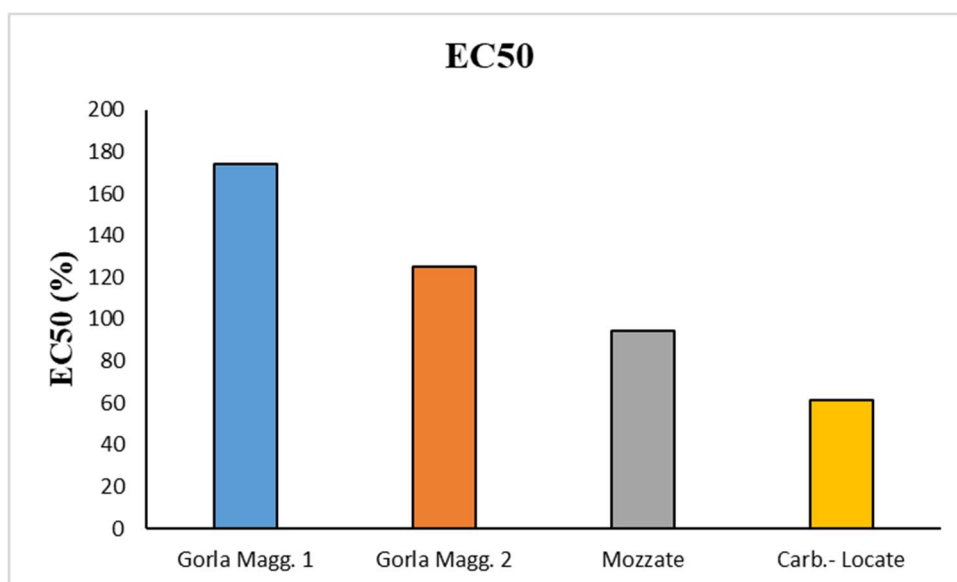


Figura 41– Stima della EC_{50} derivante dalla curva dose- risposta dal saggio di inibizione della crescita algale sui campioni di Gorla Maggiore, Mozzate e Carbonate-Locate

Come mostrato nella Figura 40, osservando le curve dose-risposta nei saggi di inibizione della crescita algale, si può osservare la presenza di un effetto inibente dei nostri campioni sulla crescita algale (dose-dipendente). In particolare, nella figura 41, il

campione di Carbonate-Locate ha mostrato effetti tossici maggiori rispetto agli altri campioni con una EC_{50} a circa il 60% della propria concentrazione rispetto al controllo.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti all'interno del presente studio hanno permesso di chiarire meglio la qualità ambientale del territorio preso in esame.

Attraverso le prove condotte in laboratorio, per quanto riguarda la qualità dei suoli, i saggi di tossicità terrestre effettuati su *E. andrei* e sul Crescione, non hanno mostrato effetti di tossicità sugli organismi trattati nei campioni, diversamente, il saggio di fitotossicità sul Sorgo, ha evidenziato effetti di tossicità sul campione di suolo proveniente dal sito di Gorla Maggiore A. Volta.

Per quanto concerne la tossicità acquatica, i saggi sul *Vibrio fisheri* e su *Daphnia magna* non hanno evidenziato effetti tossici sugli organismi trattati nei campioni di acqua superficiale analizzati. Tuttavia, nel saggio di inibizione della crescita algale, è stata rilevata tossicità nei campioni provenienti da Carbonate-Locate e da Gerenzano 1 e Gerenzano 2. A tal proposito, a causa di questa tossicità rilevata, verranno condotti studi più specifici, in modo da approfondire ulteriormente lo stato qualitativo ambientale dei siti su menzionati.

In conclusione è possibile dire che la maggior parte dei campioni non ha mostrato segni di tossicità, indicando un buono stato qualitativo dal punto di vista ambientale per la maggior parte del territorio analizzato. Tuttavia, le eccezioni rilevate suggeriscono la necessità di effettuare ulteriori monitoraggi e ulteriori indagini per garantire la sicurezza e la salute dell'area analizzata.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) *Caspersen, O. (1999)*. “The European Environment Agency”. *Global Environmental Change*, 9 (1),71-75.
- 2) ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) <http://www.isprambiente.gov.it>
- 3) ISPRA, Monitoraggio Ambientale. Sviluppo ed implementazione del processo di Valutazione di Impatto Ambientale Valutazione di Impatto Ambientale 1/12/2004 (<https://www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00000600/621-tv-monitoraggio.pdf>)
- 4) ISPRA, Aria (<https://www.isprambiente.gov.it/it/attivita/aria-1>)
- 5) ISPRA, Qualità dell’aria (<https://www.isprambiente.gov.it/it/attivita/aria-1/qualita-dellaria>)
- 6) Emily Greenfield, 2023 (<https://sigmaearth.com/it/environmental-monitoring-a-complete-guide/>)
- 7) D.lgs 155/2010 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2010-08-13;155>)
- 8) ARPA FVG (<https://www.arpa.fvg.it/temi/temi/acqua/ultimi-pubblicati/criteri-per-la-definizione-del-monitoraggio-dei-corpi-idrici-sotterranei/>)
- 9) D. lgs 152/1999 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11;152>)
- 10) D. lgs 258/200018/08/2000 (<https://www.normattiva.it/urires/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2000;258>)
- 11) D. lgs 11 maggio 1999, n. 152 allegato 1 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11;152>)
- 12) D. lgs. 152/99 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11;152>)
- 13) D. lgs. 152/99 (<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:1999-05-11;152>)

- 14) ISPRA, Linee guida per il monitoraggio
(https://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/MLG_143_16.pdf)
- 15) ISPRA, Indicatori biologici
(<https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/IBE.pdf>)
- 16) ISPRA, Qualità dei corsi d'acqua
(<https://www.isprambiente.gov.it/files/acqua/qualita-dei-corsi-acqua.pdf>)
- 17) Advances in Agricultural and Horticultural Sciences Chapter - 73 Megha Dubey, Nidhi Verma, editor Dr. Yuvraj A. Shinde; autori Dr. Yuvraj A. Shinde
(https://www.researchgate.net/profile/TejpalDahiya/publication/358899022_Biofloc_Technology_An_emerging_and_innovative_approach_for_sustainable_aquaculture_productivity/links/6253ec66ef0134206669a186/Biofloc-Technology-An-emerging-and-innovative-approach-for-sustainable-aquaculture-productivity.pdf#page=705)
- 18) EEA, Soil monitoring in Europe — Indicators and thresholds for soil health assessments 18 Jan 2023 (<https://www.eea.europa.eu/publications/soil-monitoring-in-europe>)
- 19) Synthesis s.r.l. (<https://www.synthesisrl.com/matrice-terreno.html>)
- 20) Gazzetta ufficiale, Articolo 4; Tipi di campionamento
<https://www.gazzettaufficiale.it/atto/regioni/caricaArticolo?art.progressivo=0&art.idArticolo=4&art.versione=1&art.codiceRedazionale=090R0276&art.dataPubblicazioneGazzetta=1990-09-15&art.idGruppo=0&art.idSottoArticolo=1>
- 21) Synthesis s.r.l. <https://www.synthesisrl.com/matrice-terreno.html>
- 22) <https://www.synthesisrl.com/matrice-terreno.html>
- 23) D. Lgs. 152/2006 (03/04/2006)
(<https://www.normattiva.it/urires/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2006-04-03;152>)
- 24) ISPRA Contaminazione diffusa: introduzione ed esperienza piemontese, Renzo Barberis e Gabriele Fabietti (Arpa Piemonte)
<https://www.isprambiente.gov.it/files/eventi/eventi-2015/ricerca-siti-inquinati/Barberis.pdf>
- 25) ARPAE, Francesco Forastiere (<https://www.arpae.it/it/notizie/ambiente-e-salute-l-urgenza-dei-sogni>)
- 26) Williamson, S. J. (1973). Fundamentals of air pollution. (No Title).

- 27) Ambiente e salute, Patrizia Gentilini
(<https://www.saluteinternazionale.info/2020/01/ambiente-e-salute/?pdf=17203>)
- 28) UFAM Effetti dell'inquinamento atmosferico sulla salute
<https://www.bafu.admin.ch/bafu/it/home/temi/aria/info-specialisti/effetti-dell-inquinamento-atmosferico/effetti-dell-inquinamento-atmosferico-sulla-salute.html>
- 29) Eea, (2023)
<https://www.eea.europa.eu/it/highlights/le-morti-premature-causate-dallinquinamento>
- 30) Openpolis, (2023)
<https://www.openpolis.it/il-nord-italia-e-la-zona-piu-inquinata-deuropa/>
- 31) <https://www.auxologico.it/acqua-salute-ambiente>
- 32) Truhaut, R. (1977). Ecotossicologia; obiettivi, principi e prospettive. Ecotossicologia e sicurezza ambientale 1, 151–173
- 33) C.L. Galli et al., Tossicologia, Edizione Piccin, 2016
- 34) Maffiotti et al., Introduzione all'ecotossicologia, Pitagora Editrice, 1997
- 35) Piero Dolara. – Firenze: Firenze university press, 2006
- 36) Allegrucci Massimo, Principi di Tossicologia, (2009)
- 37) Università statale di Milano
- 38) D.lgs. 155/2010 e smi (13/08/2010)
(<https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2010-08-13;155>)
- 39) ARPA Veneto
<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>
- 40) ARPA Veneto
(<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)
- 41) ARPA Veneto
(<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)
- 42) ARPA Veneto
(<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>)

- 43) ARPA Veneto
<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>
- 44) ARPA Veneto
<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/approfondimenti/inquinanti-atmosferici>
- 45) APAT 2002
https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/APAT_Guida_tecnica_indicatori_2002.pdf
- 46) SNPA 05/2017
https://www.isprambiente.gov.it/files2017/pubblicazioni/manuali-linee-guida/MLG_164_17_Man_rischio_chimico.pdf
- 47) UNI 11357:2010 UNI 11357:2010
Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in *Cucumis sativus L.* (Cetriolo), *Lepidium sativum L.* (Crescione), *Sorghum saccharatum Moench* (Sorgo) - Saggio di tossicità cronica breve
- 48) Protocollo del saggio di fitotossicità sul sorgo e sul crescione rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri
- 49) OECD (2016), Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264496-en>.
- 50) OECD (2004), Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.
- 51) Protocollo del saggio di immobilizzazione acuta su *Daphnia magna* rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri
- 52) OECD (2011), Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>.
- 53) UNI EN ISO 8692:2012
Qualità dell'acqua - Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi

- 54) Protocollo del saggio di inibizione della crescita su *Raphidocelis subcapitata* rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri
- 55) UNI EN ISO 11348-3:2019
Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti) - Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati
- 56) APAT 2004
https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/APAT_Guida_tecnica_indicazioni_2004.pdf
- 57) Protocollo del saggio di inibizione della bioluminescenza su *Vibrio fischeri* rilasciato dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri