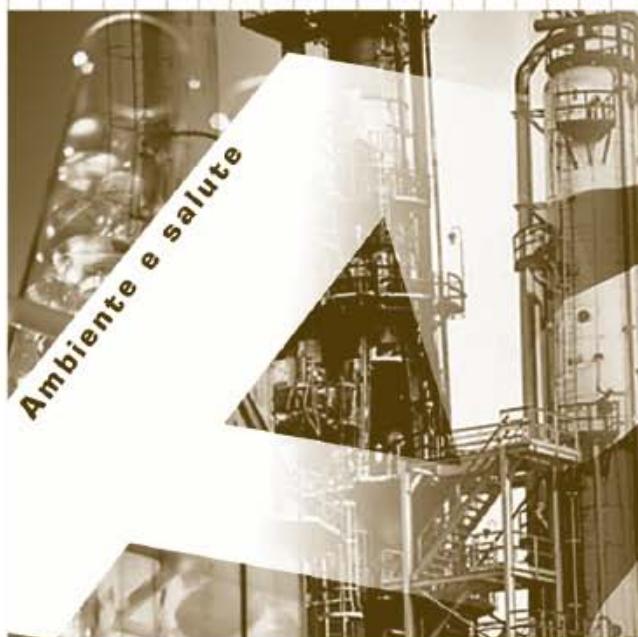




# Rapporti ISTISAN

11/23



Seminari del Dipartimento di Ambiente  
e Connessa Prevenzione Primaria  
2010



ISSN 1123-3117

A cura di  
S. Cacioli e L. Musmeci

www.iss.it



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Seminari del Dipartimento di Ambiente  
e Connessa Prevenzione Primaria  
2010**

A cura di  
Silvana Caciolli e Loredana Musmeci  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

ISSN 1123-3117  
**Rapporti ISTISAN**  
**11/23**

Istituto Superiore di Sanità

**Seminari del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria 2010.**

A cura di Silvana Caciolli e Loredana Musmeci

2011, iii, 100 p. Rapporti ISTISAN 11/23

L'interesse e la partecipazione dimostrata dal personale ai Seminari organizzati negli scorsi anni dal Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ha indotto la Dirigenza a riproporre le iniziative anche nel 2010. I Seminari, che si sono svolti con una cadenza mensile, da febbraio a dicembre, per un totale di 12 ore di formazione, hanno contribuito a diffondere una maggiore conoscenza delle svariate competenze di uno dei più numerosi Dipartimenti dell'Istituto Superiore di Sanità. In questo Rapporto sono riportati solo alcuni dei contributi presentati nei Seminari nell'arco dell'anno, in rappresentanza di 11 dei 16 Reparti che costituiscono il Dipartimento. Un riconoscimento va espresso a tutti i relatori, in particolar modo ai giovani non ancora strutturati, per l'impegno e la competenza dimostrati e la cui collaborazione ha reso possibile, ancora una volta, la realizzazione di un'iniziativa diventata ormai un' apprezzata occasione di informazione e di formazione.

*Parole chiave:* Qualità ambientale; Tutela della salute; Epidemiologia

Istituto Superiore di Sanità

**Seminars of the Department of Environment and Primary Prevention 2010.**

Edited by Silvana Caciolli and Loredana Musmeci

2011, iii, 100 p. Rapporti ISTISAN 11/23 (in Italian)

The personnel of the Department of Environment and Primary Prevention showed a great interest in the seminars organized by the Department in previous years and thus the management proposed new initiatives in 2010. The seminars, which were held monthly from February to December, for a total of 12 hours of training, helped to spread greater knowledge on many tasks of one of the largest Departments of the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy). This report contains only some of the contributions presented throughout the year, by 11 of the 16 Units of the Department. Acknowledgment must be expressed to all speakers, especially young people not yet structured, for the commitment and capability demonstrated and whose cooperation has made possible, once again, the realization of an initiative which has become a valuable opportunity of information and training.

*Key words:* Environmental quality, Health protection; Epidemiology

Per informazioni su questo documento scrivere a: [silvana.caciolli@iss.it](mailto:silvana.caciolli@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Caciolli S, Musmeci L (Ed.). *Seminari del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria 2010*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011 (Rapporti ISTISAN 11/23).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



# INDICE

<b>Premessa</b> .....	iii
<b>Dimetilfumarato in prodotti essiccanti: metodiche e risultati</b>	
<i>Patrizia Stefanelli</i> .....	1
<b>Valutazione della tossicità e genotossicità indotta <i>in vivo</i> nel topo da un contaminante alimentare: il furano</b>	
<i>Paola Leopardi Dittajuti</i> .....	8
<b>Sviluppo di un'indagine epidemiologica in un sito inquinato: lo studio dei lavoratori del petrolchimico di Gela</b>	
<i>Roberto Pasetto</i> .....	16
<b>Biomonitoraggio di perfluorooottanosulfonato e acido perfluorooottanoico nella popolazione generale italiana</b>	
<i>Anna Maria Ingelido</i> .....	24
<b>Presenza di metalli allergeni in bigiotteria, piercing e colori per tatuaggi</b>	
<i>Giovanni Forte, Francesco Petrucci, Stefano Caimi, Beatrice Bocca</i> .....	35
<b>Fioriture di cianobatteri tossici in acque dolci: un approccio integrato per la valutazione e la gestione del rischio</b>	
<i>Simona Scardala, Mara Stefanelli, Susanna Vichi</i> .....	46
<b>Monitoraggio di un'area urbana di Roma: studio dell'andamento annuale e stagionale dei Composti organici volatili</b>	
<i>Marco De Felice, Roberta Morlino, Sergio Fuselli</i> .....	64
<b>Comunicazione tecnico-scientifica in recenti casi di emergenze idro-potabili: criticità e spunti di discussione</b>	
<i>Luca Lucentini, Chiarina Lucia</i> .....	74
<b>Diatomee come indicatori degli ecosistemi acquatici di transizione</b>	
<i>Camilla Puccinelli</i> .....	82
<b>Valutazione della qualità dei sedimenti nei corpi idrici: attività istituzionale e di ricerca</b>	
<i>Mario Carere</i> .....	93



## PREMESSA

Il Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità, in un'ottica di promozione e informazione delle proprie specifiche attività e di valorizzazione delle risorse umane, organizza dal 2008 un ciclo annuale di Seminari, che si svolgono con cadenza mensile, tenuti da giovani ricercatori del Dipartimento.

Scopo di questa iniziativa è stato di favorire lo scambio di conoscenze ed esperienze tra il personale e facilitare la diffusione dell'informazione sulle varie attività che si svolgono in un Dipartimento così eterogeneo come il nostro.

Nel 2010 hanno partecipato all'iniziativa 17 colleghi provenienti dai 16 reparti che costituiscono uno dei più numerosi Dipartimenti dell'Istituto; in questo rapporto sono stati raccolti alcuni dei contributi che testimoniano le numerose e svariate competenze che affluiscono alla struttura e la professionalità e l'impegno del personale che vi ha partecipato. Nell'ambito delle iniziative sono stati trattati numerosi argomenti che hanno spaziato dalla valutazione della tossicità e genotossicità di contaminanti alimentari al biomonitoraggio; dallo sviluppo di studi epidemiologici alla presenza ambientale di sostanze organiche volatili, dalla qualità biologica delle acque, fino al tema sempre attuale della comunicazione tecnica-scientifica in casi di emergenza.

L'iniziativa, giunta al secondo anno di esperienza, ha rappresentato per il personale del Dipartimento un importante momento di confronto e si è rivelato un volano per nuove e proficue collaborazioni. A dimostrazione di ciò la costante e numerosa partecipazione dei colleghi alle singole iniziative e l'attiva collaborazione che ha reso possibile la pubblicazione di questo volume.

Per il futuro si ritiene di proseguire questa esperienza che ha rappresentato un importante momento di formazione specifica, in particolar modo per il personale tecnico-scientifico non strutturato, non escludendo però, un domani, la possibilità di individuare nuove modalità di comunicazione/informazione che permettano di mantenere costantemente aggiornato il personale e nello stesso tempo lo sappiano valorizzare.

*I curatori*



# DIMETILFUMARATO IN PRODOTTI ESSICCANTI: METODICHE E RISULTATI

Patrizia Stefanelli

*Reparto Antiparassitari, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Il DiMetilFumarato (DMF) è un estere dell'acido fumarico che ha trovato applicazione in passato come biocida antimuffa. È una sostanza deumidificante caratterizzata da elevata igroscopicità e potere fungicida. È utilizzato come biocida in alternativa del classico silica gel per evitare il deterioramento dei prodotti in pelle durante il loro trasporto e immagazzinamento in condizioni climatiche di elevata umidità (1).

L'impiego del DMF in Europa non è autorizzato secondo la normativa vigente (2).

A partire dall'anno 2008, il DMF è stato ritenuto la causa di numerosi gravi casi di dermatite allergica associati a contatto con la tappezzeria di divani e poltrone e con scarpe di importazione da paesi monsonici (3-5).

A seguito di queste osservazioni, la Commissione dell'Unione Europea ha emanato nel marzo del 2009 una decisione, la 251 con la quale si impone a tutti gli stati membri di garantire che non vengano immessi e messi a disposizione prodotti contenenti DMF (6). In Italia, a seguito di questa richiesta, il Ministero della Salute ha avviato una capillare attività di vigilanza e controllo sulle merci all'importazione con un occhio di riguardo per i prodotti di provenienza asiatica e su tutto il territorio nazionale. Inoltre ha richiesto alle autorità sanitarie regionali di segnalare tutti i casi di dermatite associati all'esposizione a DMF.

Il Ministero della Salute ha inoltre chiesto al Nucleo AntiSofisticazione dei Carabinieri (NAS) di verificare in ambito nazionale, ai sensi del DL.vo 65/2003 relativo alla classificazione, imballaggio ed etichettatura dei preparati pericolosi, presso i singoli importatori e distributori, la presenza dei dati di composizione relativi alle bustine di materiale essiccante ed ha disposto che in assenza di questi dati tutti gli articoli, con annesse bustine, fossero sottoposti a ritiro dal mercato e a sequestro cautelativo (7). Il Ministero della Salute ha disposto, relativamente agli articoli sequestrati, il campionamento con il criterio di casualità e la valutazione analitica per la determinazione del DMF nelle bustine di gel di silice presso il Reparto Antiparassitari dell'Istituto Superiore di Sanità.

L'attività di analisi/controllo ha interessato 32 province di prelevamento per un totale di 153 campioni di bustine di materiale essiccante.

La Decisione 251 ha fissato un limite massimo di presenza del DMF pari a 0,1 mg/kg di prodotto parte di esso ed ha stabilito che il metodo di analisi dovrebbe essere in grado di quantificare in modo affidabile questo valore di conseguenza il limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) dovrebbe essere pari o inferiore a 0,1 mg/kg.

Il Decreto Ministeriale (8) di recepimento della suddetta decisione emanato dal Ministero dello Sviluppo Economico d'intesa con il Ministero della Salute, rispetto al metodo di analisi ha assunto una posizione più di cautela se si considera quanto segue: "Il limite di quantificazione deve essere adeguatamente inferiore a 0,1 mg/kg a garanzia dell'affidabilità del risultato".

## Materiali e metodi

Il metodo prevede l'estrazione con solvente mediante l'impiego di un bagno riscaldante ad ultrasuoni, la determinazione gascromatografica (*Gas Chromatography*, GC) con rivelatore a spettrometria di massa mediante un analizzatore a trappola ionica, operante a scansione totale (SCAN), e la determinazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) con rivelatore a serie di diodi (*Diode Array Detector*, DAD).

Pesare un'aliquota da saggio vicina a 10 g ( $a \pm 0,01$  g) e aggiungere 10 mL di acetonitrile. Estrarre per 20 min a 60° C in un bagno ad ultrasuoni.

Filtrare la soluzione mediante filtri a membrana, diametro dei pori da 0,45  $\mu\text{m}$ .

I residui di DMF sono determinabili usando un gas cromatografo equipaggiato con un sistema di iniezione splitless e un rivelatore a spettrometria di massa a trappola ionica : Varian System Saturn 2000, dotato di una colonna capillare VF – 35ms (30m x 0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu\text{m}$  spessore di fase).

I residui di DMF sono determinabili usando un cromatografo liquido ad alta prestazione equipaggiato con un rivelatore DAD: *Varian System 9012 Q* interfacciato con un rivelatore DAD *Varian 9065 Polycrom*, dotato di una colonna impaccata Nucleosil C18, 250 mm x 4 mm d.i. x 5  $\mu\text{m}$ . Fase mobile: Acetonitrile – Acqua acidificata, in gradiente.

## Risultati e discussione

Il primo *step* è stato quello di mettere a punto un metodo affidabile, semplice e rapido per la determinazione di DMF in silica gel, considerando che a livello bibliografico, fino al 2009, erano disponibili pochissime informazioni (9).

Tests preliminari sono stati condotti per caratterizzare il metodo con le migliori condizioni sperimentali.

Diversi fattori sono stati investigati. In particolare, il solvente e la temperatura di estrazione, e la fase stazionaria della colonna capillare gascromatografica. La Figura 1 mostra una *flowchart* dei singoli passaggi.

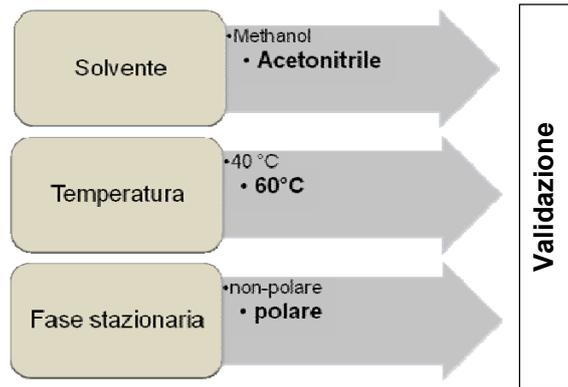
Tra i solventi estraenti, l'acetonitrile è risultato essere più selettivo. Infatti, un elevato numero di composti co-estrattivi potrebbero interferire con l'analisi del DMF nelle bustine di gel di silice.

La presenza negli estratti di elevate concentrazioni di molecole co-eluenti può causare effetti negativi; particolarmente rilevanti quando s'impiega come sistema di rivelazione uno spettrofotometro di massa a trappola ionica.

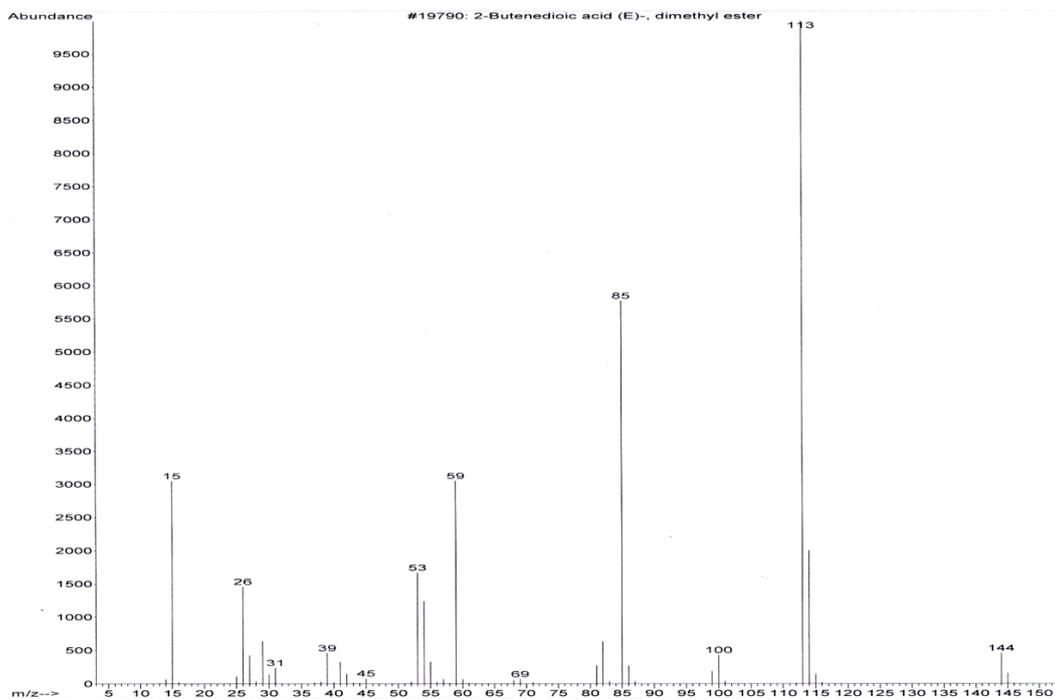
La temperatura di 60°C ha garantito una maggior efficienza di estrazione; mentre una fase stazionaria polare quale la 35% metilfenilpolisilossano (VF-35 ms) ha garantito un'accettabile asimmetria del picco cromatografico con valori di fattore di taglio ( $T = W/2f$ ) pari a 0,88 cioè notevolmente inferiore al criterio di accettabilità ( $T \leq 2$ ) stabilito dalle procedure di controllo qualità per la forma del picco cromatografico (10).

Lo spettro di massa del DMF è molto semplice e caratterizzato da masse molto basse (Figura 2). Il peso molecolare del DMF è 144 (g/mol). L'identificazione è stata focalizzata sulle masse più caratteristiche: 85 m/z, 113 m/z, 114 m/z.

Il 113 m/z è stato scelto come ione di quantificazione.



**Figura 1. Diagramma di flusso dello sviluppo del metodo analitico per la determinazione del DMF in prodotti essiccanti**



**Figura 2. Spettro di massa del DMF**

In considerazione dell'ampio range di concentrazione (fino ad un massimo di 8000 mg/kg) riscontrato nel corso della nostra attività di sorveglianza, parallelamente si è sviluppato un metodo di determinazione strumentale basato su HPLC operante con un rivelatore DAD.

Definito il metodo, si è proceduto alla sua validazione. La validazione del metodo è stata condotta prendendo in considerazione i criteri espressi dalla linea guida SANCO/10684/2009 (11).

Sono state investigate le seguenti caratteristiche prestazionali: specificità, accuratezza, precisione, linearità, limite di rivelabilità e limite di quantificazione, e incertezza della misura.

Il metodo è risultato essere accurato con recuperi medi del 97% condotti al livello di 0,05 mg/kg e 1 mg/kg, e ripetibile con deviazione standard relativa (*Relative Standard Deviation*, RSD) inferiore al 15%. Si è riscontrata una buona linearità con un valore di  $R > 0,9998$  nell'intervallo tra 0,05 µg/mL e 1 µg/mL.

La procedura garantisce una buona specificità con limiti di rivelabilità di 0,02 mg/kg e limite di quantificazione di 0,05 mg/kg (12).

Il metodo impiegato assicura la qualità del risultato, è affidabile e rapido, caratteristica questa molto importante se si considera che, nel corso dell'anno 2009, il Ministero della Salute ha trasmesso all'ISS un totale di 153 campioni che abbiamo provveduto ad analizzare in doppio.

L'attività di controllo ha interessato 32 province di prelevamento distribuite su tutto il territorio nazionale. La percentuale massima ha interessato la provincia di Alessandria con un valore del 27%; seguita da Napoli con il 12%; Cagliari il 6%; Udine, Potenza e Padova con un valore del 5%; Venezia il 4%; Catania, Firenze e Perugia con il 3% mentre le restanti province oggetto di prelevamento mostrano percentuali dell'ordine di 1% e 2% sul totale.

Nella Tabella 1 sono riportate le frequenze e le percentuali di campioni analizzati in ogni singola provincia, caratterizzando la frequenza dei singoli casi in funzione dei livelli di concentrazione riscontrati. Le elaborazioni statistiche sono state ottenute mediante l'applicazione del software di elaborazione statistica STATA.

**Tabella 1. Correlazione tra i livelli di concentrazione e le province di prelevamento espressa in termini di frequenza e percentuale di campioni analizzati**

Province	A	B	C	D	E	F	Totale	
Alessandria	38 90,8	1 2,38	2 4,76	0 0,00	0 0,00	1 2,38	42 100,00	Freq %
Bari	0 0,00	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Brescia	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Cagliari	2 22,22	5 55,56	1 11,11	1 11,11	0 0,00	0 0,00	9 100,00	Freq %
Campobasso	2 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Catania	2 50,00	2 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	4 100,00	Freq %
Cosenza	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Cuneo	0 0,00	0 0,00	3 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	3 100,00	Freq %
Firenze	0 0,00	0 0,00	1 20,00	0 0,00	0 0,00	4 80,00	5 100,00	Freq %
Foggia	0 0,00	1 33,33	2 66,67	0 0,00	0 0,00	0 0,00	3 100,00	Freq %
Frosinone	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Lecce	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Lecco	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Lucca	0 0,00	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %

segue

continua

Province	A	B	C	D	E	F	Totale	
Matera	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	2 100,00	Freq %
Napoli	7 36,84	8 42,11	3 15,79	0 0,00	0 0,00	1 5,26	19 100,00	Freq %
Oristano	1 33,33	2 66,67	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	3 100,00	Freq %
Padova	5 71,43	1 14,29	1 14,29	0 0,00	0 0,00	0 0,00	7 100,00	Freq %
Pavia	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Perugia	4 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	4 100,00	Freq %
Pordenone	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Potenza	1 12,50	2 25,00	4 50,00	1 12,50	0 0,00	0 0,00	8 100,00	Freq %
Reggio Calabria	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Rieti	0 0,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	1 50,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Roma	0 0,00	0 0,00	2 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Sassari	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Teramo	0 0,00	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Treviso	0 0,00	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Trieste	1 50,00	1 50,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 100,00	Freq %
Udine	5 62,50	1 12,50	1 12,50	1 12,50	0 0,00	0 0,00	8 100,00	Freq %
Venezia	3 60,00	1 20,00	1 20,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	5 100,00	Freq %
Vicenza	1 100,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	1 100,00	Freq %
Totale	77 50,33	35 22,88	24 15,69	3 1,96	2 1,31	12 7,84	153 100,00	Freq %

Intervalli di concentrazione **A**: <0,1mg/kg; **B**: 0,1-1 mg/kg; **C**: 1-5 mg/kg; **D**: 5-10 mg/kg; **E**: 10-30mg/kg; **F**: >30 mg/kg

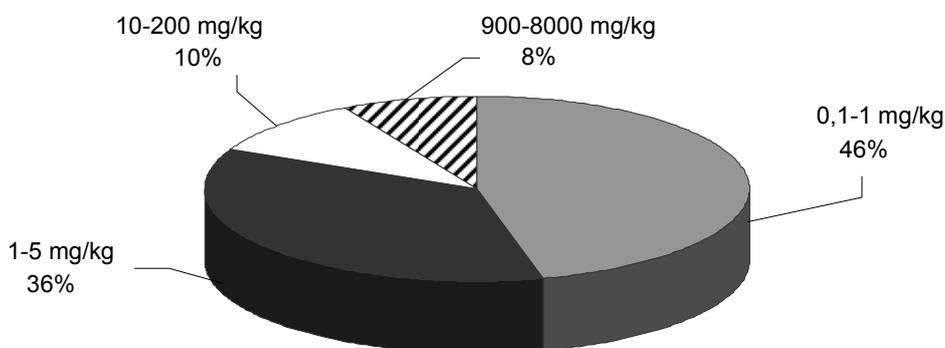
Ad esempio nella provincia di Alessandria sono stati effettuati 42 prelevamenti e dall'analisi dei campioni prelevati in 38 casi sono stati riscontrati livelli di concentrazione inferiori al limite di legge (Limite Massimo, LM: 0,1 mg/kg), in 2 casi è risultata una concentrazione nell'intervallo tra 1-5 mg/kg e in un solo caso sono emersi valori superiori a 30 mg/kg.

Per quanto concerne invece la provincia di Firenze da 5 campioni analizzati è risultata una percentuale di livelli di concentrazione superiori a 30 mg/kg nell'80% dei casi.

Su un totale di 153 campioni solo dodici hanno presentato livelli di concentrazione superiori a 30 mg/kg.

La presenza di DMF maggiore di 0,1 mg/kg è stata rilevata su un numero di 76 campioni, con una concentrazione minima pari a 0,14 mg/kg e una massima di 7145 mg/kg, caratterizzando l'indagine da un ampio range di concentrazione. Il valore di concentrazione medio rilevato è stato 174,6 mg/kg, mentre il valore mediano pari a 1,4 mg/kg.

La preponderanza dei campioni risultati positivi presenta livelli di concentrazione tra 0,1-1 mg/kg con percentuali del 46% e tra 1-5 mg/kg con il 36%. Mentre solo il 10% e l'8%, hanno presentato livelli di concentrazione notevolmente alti, corrispondenti ai due seguenti intervalli di concentrazione: 10-200 mg/kg e 900-8000 mg/kg. Il dettaglio dei risultati è illustrato in Figura 3.



**Figura 3. Livelli di concentrazione di DMF riscontrati in campioni di gel di silice**

## Bibliografia

1. Lammintausta K, Zimerson E, Hasan T, Susitaival P, Winhoven S, Gruvberger B, Beck M, Williams JD, Bruze M. An epidemic of furniture-related dermatitis: searching for a cause. *Contact dermatitis and allergy* 2010;162:108-16.
2. Comunità Europea. Direttiva 98/8/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 febbraio 1998 relativa all'immissione sul mercato dei biocidi. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L123/1, 24 aprile 1998.
3. Gimenez-Arnau A, Silvestre JF, Mercader P, De la Cuadra J, Ballester I, Gallardo F, PujolR M, Zimerson E, Bruze M. Shoe contact dermatitis from dimethyl fumarate: clinical manifestations, patch test results, chimica analysis, and source of exposure. *Contact dermatitis* 2009;61:249-60.
4. Foti C, Zambonin CG, Cassano, N, Aresta A, Damascelli A, Ferrara F, Vena GA. Occupational allergic contact dermatitis associated with dimethyl fumarate in clothing. *Contact dermatitis* 2009;61:122-4.
5. Davanzo F, Settini L, Stefanelli P, Bartolini G, Barciocco D, Sesana F, Borghini R, Panzavolta G, Fonda A. A case of contact dermatitis to dimethylfumarate in shoes identified in Italy. *Annali Istituto Superiore Sanità* 2010;46(4):366-9.
6. Unione Europea. Decisione della Commissione del 17 marzo 2009 che impone agli Stati membri di garantire che non vengano immessi o messi a disposizione sul mercato prodotti contenenti il Biocida dimetilfumarato. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 74/32 del 20 marzo 2009.
7. Fonda A, Stefanelli P, Girolmetti S, Santilio A, Dommarco R, La Sala L. Prevenzione di dermatidi acute da DMF: vigilanza sui prodotti di importazione. In: *Atti del 44° Congresso Nazionale della Società Italiana di Igiene*. Venezia 3-6 ottobre 2010. p. L207.
8. Italia. Decreto ministeriale del Ministero dello Sviluppo Economico del 13 aprile 2010. Attuazione della Decisione della Commissione europea del 17 marzo 2009, n. 251, inerente disposizioni relative

all'immissione e alla messa a disposizione sul mercato di prodotti contenenti il biocida dimetilfumarato. *Gazzetta ufficiale della Repubblica italiana* 102, 4 maggio 2010.

9. Lamas JP, Sanchez-Prado L, Garcia-Jares C, Llompert M. Determination of dimethyl fumarate in desiccant and mouldproof agents using electron-capture detection. *J Chromatogr A* 2009;1216:5755-8.
10. Center for Drug Evaluation and Research. *Reviewer guidance. Validation of chromatographic methods*. Rockville, MD: CDER US FDA; 1994.
11. European Commission. *Method of validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2009. (Doc. SANCO/10684/2009).
12. Stefanelli P, Attard Barbini D, Girolimetti S, Santilio A, Dommarco R. Determination of Dimethyl Fumarate (DMFu) in silica gel pouhes using gas chromatography oupled Ion Trap mass spectrometry. *J Health Env Science Part B* 2011;46:341-9.

# VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ E GENOTOSSICITÀ INDOTTA *IN VIVO* NEL TOPO DA UN CONTAMINANTE ALIMENTARE: IL FURANO

Paola Leopardi Dittajuti

*Reparto Tossicologia genetica, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Il furano, un composto organico a struttura chimica eterociclica aromatica, lipofilo ed estremamente volatile, è presente in alcuni alimenti. La sua elevata attività epatotossica e cancerogena nel fegato di ratto e di topo, risultata negli studi di cancerogenesi condotti dal *National Toxicology Program* (NTP) nel 1993, ha indotto l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) a classificare il furano nel gruppo 2b come "possibile cancerogeno per l'uomo" (IARC, 1995). Nel 2004 la *Food and Drug Administration* (FDA) ha pubblicato dati relativi alla presenza di furano in un'ampia gamma di alimenti, in particolare in quelli conservati nei contenitori di vetro e di latta sterilizzati mediante il calore. Il furano si forma in seguito alla somministrazione di alte temperature ai fini della sterilizzazione, a partire da una serie di precursori chimici contenuti negli alimenti (acido ascorbico, carotenoidi e antociani, alcuni carboidrati e aminoacidi, oltre a numerosi acidi grassi polinsaturi). Nei cibi destinati alla primissima infanzia, in particolare, erano state messe in evidenza concentrazioni che superavano i 100 µg/kg di prodotto alimentare. Nello stesso anno, l'EFSA (*European Agency for Food Safety*) comunicava la necessità di ottenere ulteriori studi di tossicità e di esposizione ai fini di un corretto *risk assessment* sul furano (EFSA, 2004). La richiesta era basata sia sulla insufficienza di dati *in vitro* riferiti al meccanismo d'azione del furano, sia sulla considerazione che la maggior parte di dati *in vivo* erano contrastanti e inconclusivi per quanto riguardava la via di somministrazione e le dosi utilizzate. La stessa EFSA faceva inoltre rilevare che le dosi risultate cancerogene negli animali presentavano un margine di sicurezza ridotto, rispetto alle concentrazioni di furano relative alla esposizione umana.

Nell'ambito di un Progetto triennale (2007-2009) della Commissione Europea, dal titolo *Role of genetic and non-genetic mechanism in furan risk*, sono stati studiati da parte di gruppi di ricerca europei: le reazioni chimiche di formazione del furano, il metabolismo che segue all'attivazione enzimatica e l'assorbimento corporeo di furano, oltre ai meccanismi genotossici e non-genotossici implicati nella cancerogenesi, attraverso saggi sia *in vivo* nel topo e nel ratto, sia *in vitro* in varie cellule di mammifero in coltura.

## Studio *in vivo* nel topo

La potenziale attività tossica e genotossica del furano nel fegato del topo è stata valutata da parte del nostro gruppo di ricerca, attraverso uno studio sperimentale *in vivo*. Il furano, sciolto in olio di mais, è stato somministrato a topi maschi del ceppo B6C3F1 oralmente, per gavaggio, sia attraverso un trattamento ripetuto di 28 giorni a basse dosi, sia attraverso un'unica somministrazione per gavaggio a dosi acute relativamente elevate. Le dosi di furano selezionate

per il trattamento di 28 giorni, sono state le stesse che avevano indotto tumori al fegato nel topo nello studio dell'NTP -8 e 15 mg/kg di peso corporeo (pc)-, oltre a due dosi più basse, rilevanti per l'esposizione umana (2 e 4 mg/kg pc). Gli animali sono stati sacrificati 24 ore dopo l'ultimo trattamento. Per l'unica somministrazione orale del trattamento acuto sono state selezionate tre alte dosi: 15, 100 e 250 mg/kg pc, sulla base dei dati di tossicità esistenti in letteratura. In questo caso, gli animali sono stati sacrificati 3 ore dopo la fine del trattamento.

Gli effetti di tossicità sistemica, indotti in seguito a somministrazione orale ripetuta, sono stati messi in relazione con la variazione sia del peso corporeo sia del peso di una serie di organi (fegato, milza, ecc), negli animali trattati rispetto ai controlli, somministrati in parallelo con il solo solvente.

Per valutare il potenziale genotossico del furano sono state applicate sia tecniche di citogenetica classica e molecolare (micronucleo e saggio della cometa), sia metodiche di biologia molecolare (*gene-array*). Al tempo stesso, la tossicità del composto è stata studiata attraverso l'analisi di alterazioni istologiche e di marcatori specifici della proliferazione cellulare e dell'apoptosi, su sezioni di tessuto.

Sebbene un insieme consistente di dati della letteratura ponga in evidenza l'attività in generale non-genotossica del furano, un ruolo parziale della sua attività genotossica è dimostrata da una parte più esigua, ma non meno rilevante, di risultati. A questo proposito, i dati di alcuni Autori riportano che un metabolita-chiave assai reattivo, il *cis-2-butene-1,4-dial*, prodotto dopo attivazione metabolica del furano, attraverso il CYP 2E1 del citocromo P450, è in grado di legarsi alle proteine e ai nucleosidi del DNA (Burka *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Byrns *et al.*, 2002). Sono questi legami che, attraverso l'induzione di addotti covalenti con adenosina, citosina e guanosina del DNA, generano i cosiddetti *crosslink* DNA-DNA e DNA-proteine. Questi ultimi rappresenterebbero la lesione citotossica e genotossica vera e propria indotta dal furano (Byrns *et al.*, 2004; Byrns *et al.*, 2006; Peterson, 2006). L'attivazione metabolica del furano avviene principalmente a livello del fegato, l'organo che assorbe la maggiore quantità di furano corporeo (Burka *et al.*, 1991), in cui si forma il metabolita attivo (Chen *et al.*, 1995).

## Trattamento ripetuto a basse dosi

Essendo il fegato anche l'organo bersaglio della cancerogenesi nel topo (NTP, 1993), abbiamo concentrato il nostro studio sulla valutazione degli effetti tossici e genotossici del trattamento con furano sugli epatociti isolati di fresco e sulle sezioni paraffinate del fegato degli animali, dopo trattamento per gavaggio di quattro settimane a basse dosi di furano (2, 4, 8 e 15 mg/kg di pc), sciolte in olio di mais.

Il livello di proliferazione indotto è stato analizzato valutando la percentuale di epatociti che presentavano incorporazione di 2-Bromo-5deossi-Uridina (BrdU, somministrata agli animali nelle ultime 24 ore di vita), corrispondente ad una marcatura con colorante fast red.

Il livello di apoptosi indotto dal trattamento è stato messo in evidenza mediante la tecnica del TUNEL, applicata a sezioni di tessuto di fegato, in cui vengono considerate "morte" quelle cellule che mostrano una marcatura specifica con fluorocromo (nel nostro caso, fluoresceina). In queste stesse sezioni di tessuto è stata analizzata anche la presenza di eventuali alterazioni istopatologiche, dopo colorazione con ematossilina-eosina.

L'eventuale presenza di un danno indotto al DNA dal trattamento con furano è stato studiato direttamente negli epatociti isolati dal fegato degli animali sacrificati, sia mediante il saggio della cometa in ambiente alcalino, sia utilizzando un test che analizza, con tecniche di immunofluorescenza, l'eventuale marcatura con anticorpo per l'istone fosforilato H2A. Queste due metodologie mettono in evidenza la presenza di uno stesso tipo di danno al DNA, sottoforma di rotture del filamento.

Per finire, il DNA degli epatociti degli animali trattati cronicamente con la dose più alta (15 mg/kg pc) è stato isolato e analizzato mediante la tecnica molecolare dei *gene-arrays*, che utilizza la *real-time Polymerase Chain Reaction* (rt-PCR) per valutare la presenza di eventuali cambiamenti nel livello di espressione genica di geni che sono considerati rilevanti per lo studio dei meccanismi di genotossicità e di cancerogenesi.

In parallelo allo studio sul fegato degli animali sacrificati, abbiamo preso in considerazione anche le cellule della milza, un organo che è in stretta relazione con il fegato attraverso la vena porta. Dalla milza sono stati isolati i linfociti, cellule che sono in grado di proliferare in coltura dopo opportuna stimolazione con Concanavalina A, allo scopo di analizzare gli effetti del trattamento con le basse dosi ripetute di furano, durante un ciclo cellulare completo. Abbiamo potuto applicare, oltre al saggio di genotossicità che analizza la frequenza di foci fosforilati dell'istone H2A, anche il test del micronucleo, un saggio che permette di mettere in evidenza, dopo 48 ore di coltura, la presenza di micronuclei nel citoplasma cellulare di cellule binucleate, bloccate alla citocinesi mediante trattamento con citocalasina B.

I micronuclei, costituiti di materiale nucleare che non riesce a segregare correttamente nel nucleo delle cellule figlie e quindi rimane escluso dal nucleo, rappresentano un indicatore ormai ben validato di danno al DNA, sia clastogeno (in presenza di frammenti privi di centromero, dovuta all'induzione di rotture nel filamento di DNA), sia aneuploidizzante (in presenza di interi cromosomi, dovuta a difetti nella segregazione dei cromosomi o del fuso mitotico).

## Trattamento acuto

Per finire gli effetti tossici e genotossici nel fegato, indotti dopo un trattamento unico, acuto, di 3 ore, con somministrazione per gavaggio di tre alte dosi di furano (15, 100 e 250 mg/kg pc), sono stati valutati attraverso l'analisi dei parametri istopatologici sulle sezioni di fegato e mediante il saggio della cometa in ambiente alcalino sugli epatociti isolati di fresco. Quest'ultimo test è stato eseguito utilizzando anche un saggio modificato, che fa uso di un trattamento con raggi  $\gamma$  (4 Gy), per l'analisi dell'eventuale presenza di *crosslink* sul DNA.

## Risultati

### Trattamento ripetuto a basse dosi nel fegato

Mentre in seguito a somministrazione ripetuta di basse dosi di furano, il peso corporeo degli animali non presentava, a fine trattamento, alcuna differenza significativa rispetto al peso corporeo degli animali somministrati con olio di mais; al contrario, il peso del fegato, negli animali somministrati con la dose di 4 mg/kg pc, era significativamente aumentato rispetto a quello dei controlli, per un effetto evidente di iperplasia legata al trattamento con furano. Alterazioni istopatologiche sono state messe in evidenza alle due dosi più elevate (8 e 15 mg/kg pc).

Nel fegato degli animali trattati con queste dosi si osservavano zone di necrosi del parenchima, identificate attraverso la presenza di cellule con citoplasmi eosinofili e nuclei ipercromici. Negli epatociti isolati dagli stessi animali è stato osservato un aumento significativo di cellule in attiva proliferazione, marcate con fast red. Sulle sezioni di tessuto, invece, un aumento significativo di cellule apoptotiche è stato messo in evidenza solo negli animali trattati con la dose più alta di furano (15 mg/kg pc).

Nessuno dei saggi classici di genotossicità, invece, ha permesso di rilevare alcun danno al DNA nel fegato, dopo trattamento ripetuto a basse dosi di furano.

Contrariamente a questi dati, i risultati ottenuti con gli *arrays* sui campioni di fegato degli animali trattati ripetutamente con 15 mg/kg pc, una dose risultata cancerogena negli studi dell’NTP (1993) mostrano, da una parte l’induzione di un effetto tossico, sottoforma sia di una over-espressione dei geni della proliferazione cellulare e della risposta infiammatoria primaria (attivazione dei macrofagi), oltre che di una over-espressione di geni dello stress ossidativo e della produzione di Specie Reattive dell’Ossigeno (ROS), rispetto ai campioni dei controlli corrispondenti. Dall’altra parte, l’analisi di 84 geni implicati nella risposta al danno al DNA, ha messo in luce, a quella stessa dose, una over-espressione di geni coinvolti nell’arresto del ciclo cellulare (Chck1 e Chck2), della riparazione omologa (Rad51c e Rad51/1), della riparazione per BER (Xrcc1) e della *Tran-lesion synthesis* (Polk), significativamente maggiore (di 2 volte), rispetto ai campioni dei controlli abbinati.

### Trattamento ripetuto a basse dosi nella milza

In seguito a trattamento ripetuto a basse dosi di furano, nelle cellule isolate dalla milza, coltivate *in vitro*, è stato osservato un aumento significativo di foci fosforilati dell’istone H2A nelle cellule degli animali trattati sia con 8 mg/kg pc ( $p < 0,01$ ), sia con 15 mg/kg pc ( $p < 0,001$ ) (Tabella 1). L’aumento era in chiara relazione con la fase S di replicazione del DNA, visto che nei linfociti non proliferanti il numero di foci fosforilati era simile in animali trattati e di controllo.

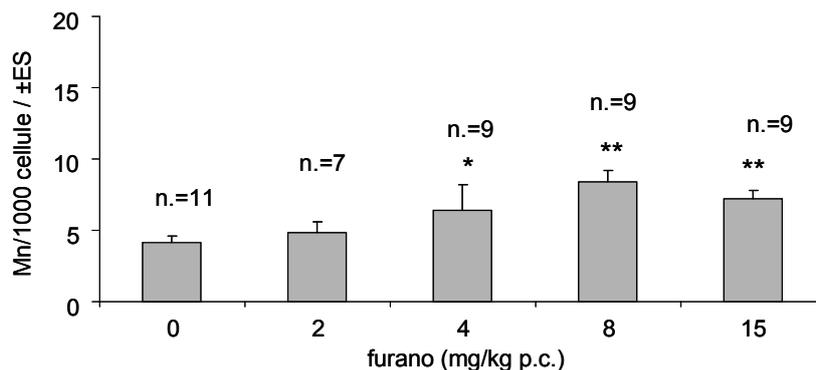
**Tabella 1. Risultati del saggio a immunofluorescenza per l’analisi dei foci  $\gamma$ -H2Ax negli splenociti di topi trattati per gavaggio con basse dosi ripetute di furano, per 28 giorni**

Furano mg/kg pc	Topi n.	Foci $\gamma$ -H2AX (%) <sup>a</sup> $\pm$ ES		
		0	<10	$\geq 10$
<b>In cellule quiescenti</b>				
0	9	79,0 $\pm$ 3,3	21,0 $\pm$ 3,3	0
4	7	83,1 $\pm$ 1,6	16,8 $\pm$ 1,8	0,1 $\pm$ 0,1
8	6	84,1 $\pm$ 3,4	15,9 $\pm$ 3,4	0
15	6	79,9 $\pm$ 7,7	20,0 $\pm$ 7,3	0,1 $\pm$ 0,1
<b>In cellule proliferanti</b>				
0	9	83,5 $\pm$ 2,6	12,9 $\pm$ 1,7	3,6 $\pm$ 1,2
4	7	84,9 $\pm$ 2,6	14,5 $\pm$ 2,6	0,6 $\pm$ 0,03
8	6	74,6 $\pm$ 1,8*	16,0 $\pm$ 1,4	9,4 $\pm$ 1,1**
15	6	68,9 $\pm$ 11,2**	11,4 $\pm$ 0,7	19,7 $\pm$ 4,7***

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$  \*\*\* =  $p < 0,0005$  (*t test di Student*).

ES: Errore Standard

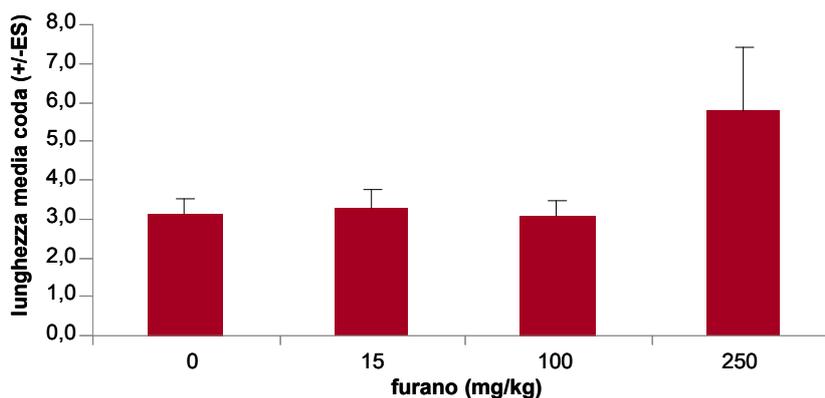
Inoltre, un aumento statisticamente rilevante della frequenza di micronuclei indotti dopo 48 ore di coltura è stato osservato già nelle cellule degli animali trattati con 4 mg/kg pc di furano ( $p < 0,05$ ), oltre che nei linfociti di quelli somministrati con le dosi 8 e 15 mg/kg pc ( $p < 0,005$ ) (Figura 1).



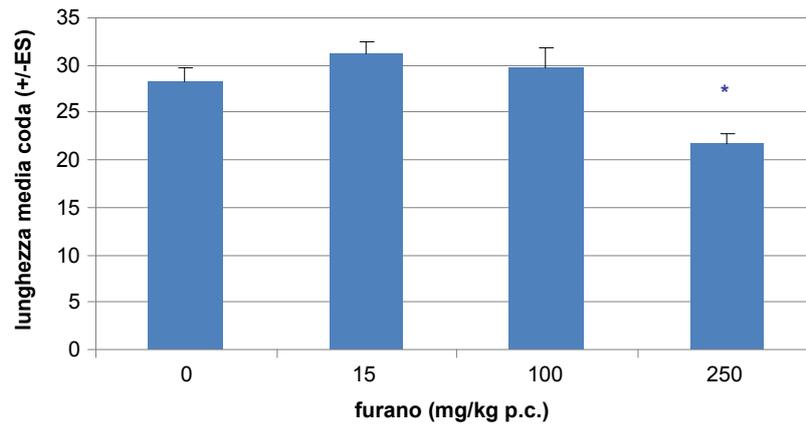
**Figura 1. Risultati del test del micronucleo negli splenociti di topi trattati per gavaggio con basse dosi ripetute di furano, per 28 giorni. Le colonne rappresentano i valori medi di ogni gruppo; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  (*t test di Student*). (n = numero topi)**

### Trattamento acuto nel fegato

La somministrazione orale di alte dosi di furano (100 e 250 mg/kg pc) ha indotto nel fegato chiari segni di tossicità. Gli animali sono sopravvissuti al trattamento, tuttavia l'analisi delle lesioni istopatologiche sulle sezioni di tessuto, dopo colorazione con ematossilina-eosina, ha mostrato la presenza di alterazioni diffuse del parenchima, con aree di necrosi e di steatosi, associata in particolare alla dose più alta di trattamento (250 mg/kg pc). Negli epatociti dei topi trattati con la stessa dose di furano, la presenza di danno al DNA, analizzata con il saggio della cometa, ha messo in evidenza un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del parametro principale di riferimento (lunghezza della coda della cometa), che sta ad indicare la presenza di rotture a singolo filamento e di siti alcali-labili indotti dal trattamento (Figura 2). Nel saggio modificato, un trattamento preventivo con raggi  $\gamma$  ha indotto negli epatociti dei topi trattati con la dose più alta di furano (250 mg/kg pc) una diminuzione significativa ( $p < 0,05$ ) della migrazione di DNA nella coda (Figura 3).



**Figura 2. Risultati del saggio della cometa in condizioni alcaline negli epatociti di topi trattati con una singola somministrazione orale di furano, raccolti 3 ore dopo la fine del trattamento. Le colonne rappresentano i valori medi di 5 animali; \* =  $p < 0,05$  (*t test di Student*)**



**Figura 3. Protocollo del saggio della cometa (protocollo modificato – trattamento con raggi  $\gamma$ ) negli epatociti di topi trattati con una singola somministrazione orale di furano. Le colonne rappresentano i valori medi di 5 animali;  $\pm$  =valori medi  $\pm$ ES rispetto ai controlli. \* =  $p < 0,05$  (*t test di Student*)**

## Conclusioni

L'analisi degli effetti genotossici indotti nelle cellule della milza è stata utile per chiarire il meccanismo di formazione del danno al DNA indotto da basse dosi ripetute di furano. Già valutando gli effetti indotti nei linfociti dalle dosi di 8 mg/kg pc, mediante l'analisi della frequenza di siti per il  $\gamma$ H2AX, è stato osservato un effetto positivo, legato al trattamento. Poiché questo effetto clastogeno del furano, relativo alla presenza di siti  $\gamma$ H2AX significativamente aumentati, si esplicava esclusivamente nei linfociti in attiva proliferazione, non nelle cellule quiescenti, abbiamo ipotizzato che, nei linfociti che si trovavano intorno alla fase S del loro ciclo cellulare, la forza di replicazione avesse introdotto delle rotture sul filamento di DNA, nei siti in cui aveva incontrato dei *crosslink*, allo scopo di mandare avanti la replicazione del DNA. In una fase seguente, nelle cellule binucleate appena divise, abbiamo osservato un aumento significativo di micronuclei, oltre che nelle cellule dei topi trattati con le stesse dosi positive per l'aumento di foci del  $\gamma$ H2AX, già anche ad una dose relativamente bassa di furano (4 mg/kg pc). Abbiamo supposto, per concludere, che i micronuclei rappresentassero la conseguenza proprio di quelle rotture al DNA introdotte durante la fase S, trasformate in rotture a doppio filamento dopo la sintesi (Leopardi *et al.*, 2010). L'effetto clastogeno, nelle cellule della milza, può essere messo in relazione con la conversione del furano nel suo metabolita attivo, il cis-2-butene-1,4-dial (Chen *et al.*, 1995; Byrns *et al.*, 2002). Quest'ultimo può formare addotti covalenti con i nucleosidi del DNA, che hanno il potenziale di formare *crosslink* DNA-DNA e DNA-proteine (Byrns *et al.*, 2004; Byrns *et al.*, 2006; Peterson, 2006).

I risultati del nostro studio indicano che la somministrazione ripetuta, per 28 giorni, di dosi relativamente basse di furano, comprese le due dosi cancerogene negli studi dell'NTP, ha causato una debole tossicità nel fegato dei topi, con l'induzione di un livello di proliferazione cellulare evidenziabile con i nostri mezzi, ma sporadica, perché mirata alla sostituzione delle cellule morte (apoptotiche), anch'esse evidenziabili solo alla dose più alta di furano (15 mg/kg pc). La valutazione degli effetti genotossici, dall'altro lato, ha messo in evidenza che un aumento significativo di danno al DNA era evidente solo nel fegato dei topi trattati con una

dose molto alta e tossica di furano (250 mg/kg pc). Il saggio modificato, in particolare, ha spiegato che il danno consisteva effettivamente nella presenza di *crosslink* sul DNA. Al contrario, nelle cellule del fegato non sono stati osservati effetti genotossici, indotti dal trattamento, nei topi somministrati per 28 giorni a basse dosi di furano, né mediante il saggio della cometa, né attraverso l'analisi dei foci fosforilati dell'H2AX ( $\gamma$ H2AX). Questi dati, devono tuttavia essere interpretati con cautela, tenendo conto che, nelle cellule della milza degli stessi topi, gli effetti genotossici sono stati messi in evidenza solo nei linfociti in attiva proliferazione. Quindi, i risultati negativi potrebbero essere messi in relazione con il livello relativamente basso di proliferazione degli epatociti, indotto dalle basse dosi di furano somministrate cronicamente. Purtroppo, l'analisi dell'espressione genica sul DNA del fegato di topi trattati con la dose cancerogena di 15 mg/kg pc, somministrata per 4 settimane, ha messo in luce la presenza di geni over-espressi, coinvolti sia nel processo di danno ossidativo e infiammazione, sia nella riparazione del DNA per escissione di basi (BER), riparazione omologa (HR) e *Trans-lesion synthesis* (TLS) (Cordelli *et al.*, 2010).

In conclusione, anche se possiamo confermare che, nell'organo target, un meccanismo relativo alla proliferazione cellulare – e quindi non-genotossico – sia coinvolto nel processo di cancerogenesi indotto dal furano, il contributo di un'evidenza non-diretta di genotossicità, come dimostrato dai nostri risultati dei *gene array*, non dovrebbe comunque essere sottovalutato.

## Ringraziamenti

Questo studio è stato finanziato con i fondi del Progetto Europeo “Furan-RA”(SSPE-CT-2006-44393). Si ringraziano per la collaborazione: Riccardo Crebelli (direttore del Reparto Tossicologia genetica) quale responsabile scientifico del Sottoprogetto Europeo, Francesca Marcon ed Ester Siniscalchi (Reparto Tossicologia genetica), Paola Villani ed Eugenia Cordelli (Sezione di Tossicologia e Scienze biomediche, ENEA-Casaccia), Stefania Caiola (Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare) per aver collaborato ai vari saggi di genotossicità in vivo, Fiorella Malchiodi-Albedi (Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze) e Caterina Macri (Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare) per aver curato la parte istologica, Luigi Conti (Reparto Tossicologia genetica) e Gabriele Deluca (Reparto Cancerogenesi chimica e computazionale) per essersi dedicati alla cura e al trattamento degli animali.

## Bibliografia

- Burka LT, Washburn KD, Irwin RD. Disposition of [14C] furan in the male F344 rat. *J Toxicol Environ Health* 1991;34:245-57.
- Byrns MC, Predecki DP, Peterson LA. Characterization of nucleoside adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* 2002 15(3):373-79.
- Byrns MC, Vu CC, Peterson LA. The formation of substituted 1, N6-etheno-2'-deoxyadenosine and 1, N2-etheno-2'-deoxyguanosine adducts by cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* 2004 17(12):1607-13.
- Byrns MC, Vu CC, Neidigh JW, Abad JL, Jones RA, Peterson LA. Detection of DNA adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. *Chem Res Toxicol*. 2006, 19(3):414-20.
- Chen L-J, Hecht SS, Peterson LA. Identification of cis-2-Butene-1,4-dial as microsomal metabolite of Furan. *Chem Res Toxicol* 1995 8(7):903-06.
- Cordelli E, Leopardi P, Villani P, Marcon F, Macri C, Caiola S, Siniscalchi E, Conti L, Eleuteri P, Malchiodi-Albedi F, Crebelli R. Toxic and genotoxic effects of oral administration of furan in mouse liver. *Mutagenesis* 2010 25(3):305-14.

- European Food Safety Authority. Report of the scientific panel on contaminants in the food chain on rovisional findings on furan in food. *EFSA J* 2004;137:1-20.
- Leopardi P, Cordelli E, Villani P, Cremona TP, Conti L, De Luca G, Crebelli R. Assessment of in vivo genotoxicity of the rodent carcinogen furan: evaluation of DNA damage and induction of micronuclei in mouse splenocytes. *Mutagenesis* 2010, 25(1):57-62.
- NTP (National Toxicology Program). *Toxicology and Carcinogenesis Studies of Furan (CAS No. 110-00-9) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies)*. Research Triangle Park, NC, USA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 1993. (NTP Technical Report No. 402).
- Peterson LA. Electrophilic intermediates produced by bioactivation of furan. *Drug Metab Rev* 2006;38(4):615-26.

# SVILUPPO DI UN'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN UN SITO INQUINATO: LO STUDIO DEI LAVORATORI DEL PETROLCHIMICO DI GELA

Roberto Pasetto

*Reparto Epidemiologia ambientale, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

La verifica di ipotesi è propria delle scienze sperimentali ma è anche l'ambizione delle discipline osservazionali come l'epidemiologia. L'epidemiologia ambientale nei siti inquinati si basa su studi dove, non solo vengono adottati disegni di studio epidemiologico di tipo osservazionale ma, nella loro scelta e nell'acquisizione delle informazioni, si è condizionati dal contesto contingente relativo ai singoli siti (si pensi a solo titolo esemplificativo al problema della numerosità campionaria, ove la popolazione interessata dall'inquinamento in una certa area rappresenta di per sé un insieme già definito nello spazio e nel tempo).

## Caratterizzazione epidemiologica di un sito inquinato

A causa dell'insieme dei limiti a cui ogni studio epidemiologico svolto nei siti inquinati è inevitabilmente sottoposto, la sua utilità va considerata nell'ambito dell'insieme di studi, non solo epidemiologici che, tra loro integrati, permettono la *caratterizzazione epidemiologica* di area (1).

La caratterizzazione epidemiologica è volta a perseguire i seguenti obiettivi principali:

- a) Valutazione di Impatto Sanitario retrospettiva (2).
- b) Contributo alla definizione delle priorità per le bonifiche.
- c) Definizione di programmi di sorveglianza epidemiologica e, se pertinente, di sorveglianza sanitaria.

Schematicamente si può prevedere che tali obiettivi vengano raggiunti attraverso diverse fasi:

- 1) definizione del profilo di pericolo dell'area inquinata, attraverso la caratterizzazione ambientale e i monitoraggi effettuati su varie matrici (3).
- 2a) caratterizzazione territoriale (1).
- 2b) prima generazione di studi epidemiologici:
  - 2b.1) studi ecologici esplorativi.
  - 2b.2) studi analitici per la verifica di ipotesi iniziali.
- 3) seconda generazione di studi epidemiologici conseguenti anche al procedere della caratterizzazione ambientale e di quella territoriale mirate all'utilizzo ai fini di indagine epidemiologica.
  - 3.a) studi ecologici basati su ipotesi meglio definite.
  - 3.b) studi analitici per la verifica di ipotesi con valutazioni più raffinate e valide di esposizioni ed effetti.

## Il caso di Gela

Gela è una città di circa 80,000 abitanti localizzata sulla costa a sud-est della Sicilia. Giacimenti di petrolio furono rinvenuti nel sottosuolo attorno alla cittadina dopo la metà degli anni '50; successivamente, dai primi anni '60, sono iniziate le attività produttive di un complesso petrolchimico costruito nelle immediate vicinanze del nucleo urbano e comprensivo di una raffineria, un impianto termoelettrico e impianti petrolchimici per la produzione di prodotti chimici di base sia di natura organica (etilene e acrilonitrile), che di inorganica (acido solforico, ammoniaca, cloro, urea). Nel 1998 un'ampia area della municipalità di Gela comprendente l'intero complesso petrolchimico e un'estesa porzione su fronte mare è stata inclusa tra gli attuali 57 Siti di Interesse Nazionale per le bonifiche dei suoli (SIN).

Dati raccolti a partire dal 2000 hanno documentato un'ampia contaminazione della falda, del suolo e dell'aria mostrando delle concentrazioni di arsenico, cloruro di vinile, mercurio, benzene diversi ordini di grandezza superiori rispetto ai limiti previsti (3). Il suolo e l'acqua di falda nel SIN di Gela sono risultati severamente contaminati anche da diversi metalli e da composti organo alogenati, le emissioni in aria di NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub> e benzene rappresentano rispettivamente 11%, 30% e 31% delle emissioni in Sicilia (4). Due studi di monitoraggio ambientale effettuati su campioni di suolo e aghi di pino hanno evidenziato che tutta l'area della città di Gela è contaminata da metalli e metalloidi (5,6). Infine, un recente studio di biomonitoraggio su di un piccolo gruppo di residenti a Gela ha evidenziato alti livelli di arsenico totale nelle urine (7). Livelli di arsenico nelle urine più alti di quelli tipici, sebbene siano indicatori di esposizioni recenti (8), sono d'interesse perché l'arsenico inorganico o i suoi metaboliti sono stati associati con effetti avversi sulla salute compreso il tumore del polmone (9-10).

Negli anni '70 il caso di Gela è stato descritto come un esempio di "industrializzazione senza sviluppo" (11) poiché l'evoluzione culturale e sociale della popolazione locale, attesa sulla base di esperienze analoghe nel nord Europa e nel nord America, non si è verificata. La situazione di Gela richiama le esperienze tipiche dei paesi in via di sviluppo, dove un processo di industrializzazione promosso solo dall'esterno non ha portato allo sviluppo socioeconomico locale (12). In tali contesti l'implementazione di programmi di monitoraggio ambientale e di bonifica sono ostacolati.

Nel 1995 un Decreto del Presidente della Repubblica richiamava alla necessità di un programma ad hoc di monitoraggio della qualità dell'aria (13), ma nel 2010 tale attività non era stata ancora implementata (14). Invece, per quanto riguarda la sorveglianza epidemiologica, sin dagli anni '90 (15-17) studi ecologici di mortalità e morbosità hanno mostrato eccessi di rischio probabilmente riconducibili al contesto espositivo negli ambienti di vita e di lavoro.

Dopo il 2000, un magistrato della Procura della Repubblica di Gela ha promosso un'indagine per valutare se le attività del petrolchimico avessero comportato un danno alla salute dei lavoratori e della popolazione generale. In tale contesto è nato e si è sviluppato lo studio della coorte dei lavoratori del petrolchimico di Gela (18). Lo studio è stato successivamente implementato nell'ambito delle attività sostenute dal Centro Europeo Ambiente e Salute dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, come parte del progetto per l'assistenza tecnica all'ufficio speciale per le aree a rischio della Regione Sicilia per lo sviluppo di piani di risanamento ambientale.

## Studio della coorte dei lavoratori del complesso petrolchimico di Gela

L'obiettivo iniziale dello studio della coorte dei lavoratori del petrolchimico di Gela è stato quello di verificare gli eventuali rischi conseguenti alle esposizioni presenti nel contesto lavorativo. La stessa base dello studio è stata utilizzata per valutare il rischio associato alla residenza a Gela.

I dettagli del ciclo di studi sono riportati in diverse pubblicazioni alle quali si rimanda per gli approfondimenti (18-23). Nel presente contributo si riportano le caratteristiche principali della metodologia e i risultati ottenuti, discutendoli poi nel quadro della caratterizzazione epidemiologica dell'area di Gela.

La coorte dei lavoratori del petrolchimico di Gela è stata studiata inizialmente per la mortalità. La coorte era costituita dai lavoratori assunti dal 1° gennaio 1960, anno in cui l'impianto ha iniziato le attività, fino al 31 gennaio 2002. Venti libri matricola di 8 diverse compagnie sono stati usati per raccogliere le informazioni anagrafiche e lavorative. La coorte comprendeva 7.147 lavoratori (6.961 uomini e 186 donne). La maggioranza dei lavoratori è transitato in diverse compagnie nel periodo di attività lavorativa nel petrolchimico e non è stato possibile ricostruire la durata lavorativa. Lo stato in vita è stato completato per il periodo 1960-2002. Le analisi di mortalità sono state ristrette alla coorte assunta nel periodo 1960-1993. Tale restrizione è stata adottata per tenere in conto un periodo minimo di 10 anni di follow-up per possibili effetti dilazionati delle esposizioni.

I lavoratori avevano diversa provenienza. Come documentato da alcuni studi sociologici, molti di essi erano di origini gelesi, ma la maggior parte proveniva da altri comuni siciliani o da altre regioni. Il 26% dei lavoratori risultava nato a Gela, il 61% in altri comuni siciliani e l'11,5% in altre regioni italiane.

Sulla base della letteratura *peer reviewed*, principalmente epidemiologica, sono state identificate le cause tumorali di maggiore interesse a priori, cioè le cause per le quali vi era evidenza più o meno forte di un'associazione con il lavoro nell'ambito di industrie chimiche/petrochimiche. Sono state selezionate le cause del tumore al fegato, bronchi e polmone, pleura, pelle, rene, sistema nervoso centrale e i tumori del sistema linfematopoietico.

La mortalità è stata studiata in termini di Rapporti Standardizzati di Mortalità (RSM) per la coorte di 6.458 uomini identificati in base ai criteri sopra esplicitati. I tassi di mortalità della regione Sicilia sono stati adottati come riferimento. Le cause di morte sconosciute hanno contribuito al calcolo degli RSM per le singole cause assumendo una distribuzione corrispondente alla frequenza relativa dei decessi con causa nota, cioè addizionando ad ogni causa un numero di casi proporzionale ai casi osservati rispetto al totale (24).

I tumori del sistema linfematopoietico e polmonari sono stati considerati quelli di maggiore interesse in base alle evidenze sul fronte occupazionale e su quello della residenza in prossimità di impianti petrolchimici (25). Analisi di confronto interne alla coorte per qualifica lavorativa, e per residenza in prossimità dell'impianto petrolchimico, sono state eseguite per tali patologie. Le analisi con confronto interno sono state ristrette a 5.627 lavoratori nati in Sicilia.

La qualifica lavorativa era l'unica informazione disponibile per distinguere l'esperienza lavorativa all'interno del complesso petrolchimico; sulla base di tale informazione i lavoratori sono stati classificati in tre categorie: impiegati, operai, lavoratori che avevano avuto entrambe le qualifiche. La residenza è stata definita in base ad assunzioni a partire dal luogo di nascita combinate con i risultati di un modello di mobilità (22); sono state identificate le seguenti categorie:

- a) *Residenti a Gela:*  
lavoratori nati a Gela;
- b) *Trasferiti a Gela quando assunti:*  
lavoratori nati in altri comuni siciliani con probabilità di essere pendolari definita dal modello di mobilità  $<0,5$ ;
- c) *Pendolari:*  
lavoratori nati in altri comuni siciliani con probabilità di essere pendolari definita dal modello  $\geq 0,5$ .

Le analisi interne alla coorte sono state eseguite calcolando il Rapporto tra tassi di Mortalità (RR) ottenuti applicando un modello di regressione di *Poisson* e controllando le stime per le variabili predittive tempo dipendenti dell'età e del periodo di calendario.

Per analizzare malattie croniche o con bassa mortalità è stato eseguito anche uno studio di morbosità utilizzando le schede di dimissione ospedaliera. Tutti i ricoveri nella regione Sicilia nel periodo 2001-2006 sono stati ricercati dal Dipartimento di Epidemiologia della Regione Sicilia. Per ogni ricovero è stato ricalcolato il codice fiscale. I ricoveri in *day-hospital*, per riabilitazione e lunga degenza, nonché i duplicati, sono stati esclusi. È stato effettuato un record *linkage* con i soggetti della coorte utilizzando il codice fiscale quale chiave di associazione e solo la diagnosi principale è stata considerata nelle analisi. Per l'identificazione finale dei casi sono state utilizzate le prime ospedalizzazioni per ogni causa di interesse *a priori*.

## Risultati

L'età mediana dei lavoratori al termine del follow-up era di 59 anni, e il 78% risultavano avere un'età inferiore ai 65 anni; il periodo mediano dall'assunzione alla fine del follow-up è risultato di 31,5 anni.

Nelle analisi con riferimento esterno (RSM) le morti osservate sono risultate in generale inferiori a quelle attese (Tabella 1). Piccoli incrementi ma con stime imprecise sono stati osservati per il tumore primario del fegato, il tumore della pleura e del rene.

**Tabella 1. Rapporti Standardizzati di mortalità (RSM) per i lavoratori assunti nel periodo 1960-1993 per le cause di maggior interesse a priori. Riferimento tassi di mortalità della regione Sicilia**

Causa di morte (IX ICD)	OSS	ATT	RSM <sup>a</sup>	IC 90%
Tutte le cause (001-999)	662	947,49	0,70	0,66-0,74
Tumori maligni (140-208)	210	297,41	0,76	0,68-0,85
Fegato primitivo (155.0)	14	11,23	1,34	0,82-2,06
Polmone (162)	66	97	0,73	0,59-0,88
Pleura (163)	4	2,31	1,86	0,59-3,96
Cute (173)	1	1,05	1,03	0,05-4,52
Vescica (188)	6	11	0,59	0,24-1,08
Rene e altri n.s. organi urinari (189)	7	5,62	1,34	0,58-2,34
Encefalo (191)	8	11,31	0,76	0,35-1,28
Sistema linfoematopoietico (200-8)	17	27,26	0,67	0,43-0,98

<sup>a</sup> RSM calcolato attribuendo proporzionalmente i 50 decessi con causa mancante alle diverse categorie di decesso in proporzione ai decessi osservati rispetto al totale

I risultati principali delle analisi interne alla coorte sono mostrati in Tabella 3. La mortalità per tutte le cause risulta essere simile nelle categorie a confronto con l'eccezione degli operai, dove il RR è in aumento avendo come riferimento la categoria degli impiegati. Gli RR sono in aumento per tutti i tumori e le cause di maggior interesse a priori negli operai e nella categoria sia operai che impiegati, avendo come riferimento gli impiegati. Per le categorie dei residenti a Gela e dei trasferiti a Gela per lavoro, gli RR per il tumore al polmone risultano essere rispettivamente 1,7 (Intervallo di Confidenza, IC, al 90% 1,03-2,81), e 1,71 (IC 90% 0,92-3,17) avendo come riferimento la categoria dei pendolari. Un eccesso nel rischio è osservato nelle stime per i tumori del sistema linfoematopoietico nella categoria dei trasferiti. In fine, risultati preliminari dello studio di morbosità hanno evidenziato un eccesso di ricoveri per le malattie respiratorie tra i residenti a Gela rispetto ai pendolari.

**Tabella 3. Rate Ratio di mortalità (RR) per qualifica e verosimiglianza di residenza a Gela per tutte le cause, tutti i tumori, tumori polmonari e tumori del sistema linfoematopoietico. Coorte degli uomini nati in Sicilia assunti nel periodo 1960-1993**

Causa di morte	ICD IX	Casi	RR <sup>a</sup> per qualifica (riferimento impiegati)		RR <sup>a</sup> per residenza a Gela (riferimento pendolari)	
			impiegati e operai <sup>b</sup> (IC 90%)	operai (IC 90%)	trasferiti (IC 90%)	residenti (IC 90%)
Tutte le cause	001-999	562	0,94 (0,72-1,21)	1,3 (1,06-1,59)	0,90 (0,73-1,11)	0,88 (0,75-1,03)
Tumori maligni	140-208	176	1,57 (0,99-2,49)	1,83 (1,23-2,71)	0,94 (0,64-1,37)	1,09 (0,82-1,44)
Tumori maligni di trachea, bronchi e polmone	162	54	2,17 (0,89-5,28)	2,24 (1,01-4,96)	1,71 (0,92-3,17)	1,7 (1,03-2,81)
Tumori maligni del sistema linfoematopoietico	200-208	15	1,91 (0,46-7,0)	1,43 (0,39-5,27)	3,0 (1,14-7,9)	0,87 (0,28-2,72)

<sup>a</sup> RR aggiustato per età, periodo di calendario

<sup>b</sup> A tale categoria appartengono i lavoratori che risultano aver avuto sia la qualifica di operaio che quella di impiegato

## Commenti e considerazioni conclusive

I principali limiti dello studio della coorte dei lavoratori del petrolchimico di Gela sono dovuti alla mancanza d'informazioni per definire le esposizioni individuali lavorative e residenziali. Solo dati sulla qualifica erano disponibili per la storia occupazionale, mentre la residenza è stata definita indirettamente tramite un approccio qualitativo.

I decrementi osservati nell'analisi di RSM sono probabilmente da ricondurre all'Effetto Lavoratore Sano (ELS). L'ELS è un fenomeno tipico delle analisi occupazionali con riferimento esterno ed è tipicamente caratterizzato da un difetto di mortalità per tutte le cause combinate, le malattie cardiovascolari e respiratorie. L'ELS può essere spiegato da fenomeni di selezione dei lavoratori che avvengono in due fasi: quando individui relativamente sani accedono e rimangono al lavoro e quando individui in cattivo stato di salute sono selezionati per l'interruzione del lavoro (24), quest'ultimo fenomeno introduce dei limiti nelle analisi per durata lavorativa che, comunque, non sono state possibili nella coorte di Gela.

Lo studio sopra esposto fornisce un contributo generale alla valutazione del rischio occupazionale nel petrolchimico evidenziando un rischio superiore negli operai rispetto agli impiegati per le patologie tumorali di maggior interesse a priori. Per quanto riguarda l'analisi del rischio nel contesto lavorativo, un risultato secondario è stato ottenuto durante l'attività di focus group (20) sviluppata per verificare il fenomeno del pendolarismo e condotta tra gli ex-lavoratori nel Reparto Cloro soda. Al di là di confermare la rilevanza del fenomeno del pendolarismo, durante quell'attività è stato possibile informare i lavoratori sui rischi presenti nell'unità cloro-soda (operante nel petrolchimico nel periodo 1970-1994) e come procedere con istanze di compensazione per il rischio occorso nel contesto lavorativo.

Le analisi interne alla coorte per il tumore polmonare non sono state controllate per l'abitudine al fumo per la mancanza di informazioni al riguardo. La mancanza di dati relativi a possibili confondenti è un problema comune negli studi occupazionali retrospettivi, anche se è stato dimostrato che esempi di confondimento sostanziale sono rari in epidemiologia occupazionale (26). L'assenza di informazioni sulla durata del lavoro e della residenza sono altri limiti rilevanti nell'interpretazione dei risultati.

Dal punto di vista della caratterizzazione epidemiologica del SIN di Gela, i risultati ottenuti dallo studio della coorte dei lavoratori vanno inquadrati come segue. Alcuni studi ecologici di mortalità nella popolazione residente a Gela hanno evidenziato un eccesso di rischio per il tumore al polmone tra gli uomini (15) e in anni recenti anche tra le donne (16-17). Studi ecologici hanno evidenziato anche un eccesso di morbilità per patologie acute e croniche del sistema respiratorio tra i residenti a Gela (16). È stato proposto che tali eccessi fossero dovuti all'evidenza, a livello di popolazione generale, dell'emergere del rischio in ambito occupazionale (15-16). I risultati dello studio della coorte dei lavoratori del petrolchimico suggerisce una spiegazione alternativa. Le analisi della coorte con riferimento esterno hanno mostrato un difetto nelle stime di rischio per tumore al polmone, mentre le analisi interne hanno evidenziato un eccesso di rischio di mortalità per tumore al polmone e di morbilità per malattie respiratorie non tumorali (risultati preliminari) nei lavoratori con maggiore probabilità di residenza a Gela.

In conclusione, i risultati relativi alle malattie respiratorie nei residenti a Gela sostengono l'urgente necessità dello sviluppo di un adeguato programma di monitoraggio dell'aria, come raccomandato sin dal 1995 ma non ancora implementato (14). Una valutazione completa della qualità dell'aria dovrebbe integrare i dati disponibili sulla contaminazione delle acque e del suolo, contribuendo ad identificare le principali sorgenti di esposizione a sostanze tossiche di particolare rilievo sul fronte sanitario come, ad esempio, l'arsenico. I risultati dello studio suggeriscono anche lo sviluppo di un adeguato sistema di sorveglianza epidemiologica delle malattie respiratorie acute e croniche.

## Ringraziamenti

Si ringraziano i colleghi del Reparto Epidemiologia ambientale che hanno contribuito allo studio, in particolare, Pietro Comba, Roberta Pirastu e Amerigo Zona.

## Bibliografia

1. Pasetto R, Benedetti M, Fazzo L, Iavarone I, Trinca S, Comba P. Impatto sanitario nei siti inquinati: caratterizzazione epidemiologica e ruolo delle ipotesi *a priori*. In: Comba P, Bianchi F, Iavarone I, Pirastu R (Ed.). *Impatto sulla salute dei siti inquinati: metodi e strumenti per la ricerca e le valutazioni*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/50). p. 22-36.

2. Martuzzi M, Cocchi M. Valutazione di impatto sanitario: uno strumento di valutazione e di partecipazione. In: Bianchi F, Comba P (Ed.). *Indagini epidemiologiche nei siti inquinati: basi scientifiche, procedure metodologiche e gestionali, prospettive di equità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (Rapporti ISTISAN 06/19). p. 71-7.
3. Musmeci L, Carere M, Falleni F. La contaminazione ambientale nell'area di Gela. *Epidemiol Prev* 2009;33 (suppl 1):18-23.
4. APAT. INES (Inventario Nazionale delle Emissioni e loro Sorgenti) ed EPER (European Pollutant Emission Register). Consultabile da: <http://www.eper.sinanet.apat.it/site/it-IT/>; ultima consultazione 6/10/11.
5. Bosco ML, Varrica D, Dongorrà G. Case study: inorganic pollutants associated with particulate matter from an area near a petrochemical plant. *Environ Res* 2005;99:18-30.
6. Manno E, Varrica D, Dongorrà G. Metal distribution in road dust samples collected in an urban area close to a petrochemical plant at Gela, Sicily. *Atmos Environ* 2006;40:5929-41.
7. Bianchi F, Bustaffa E, Cori L, Imbriani M, Minichilli F, Migliore S, Minoia C, Ronchi A, Turci R. Human biomonitoring in the area around the petrochemical site of Gela, Sicily, Italy. In atti del Convegno: Epidemiology and Public Health in an evolving Europe. *International Epidemiological Association. Epidemiol Prev* 2010;34(5-6) suppl 1:82.
8. Hughes MF. Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ Health Perspect* 2006;114:1790-6.
9. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, et al. Special Report: Policy. A review of human carcinogens-Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *The Lancet* 2009;10:453-4.
10. Smith AH, Ercumen A, Yuan Y, Steinmaus CM. Increased lung cancer risks are similar whether arsenic is ingested or inhaled. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2009;19:343-8.
11. Hytten E, Marchioni M. *Industrializzazione senza sviluppo. Gela: una storia meridionale*. Milano: Franco Angeli; 1970.
12. Pellizzoni L. Il futuro di un'area a rischio: ambiente, economia e società a Gela. In: Saitta P (Ed.). *Spazi e società a rischio. Ecologia, petrolio e mutamento a Gela*. Napoli: Think Thanks; 2009. p. 171-96.
13. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 17.01.1995. Piano di disinquinamento per il risanamento del territorio della provincia di Caltanissetta-Sicilia Orientale. *Gazzetta Ufficiale* n.100 02.05.1995, supplemento ordinario n.51.
14. Settimo G, Mudu P, Viviano G. L'inquinamento atmosferico: problematiche generali nell'area di Gela. *Epidemiol Prev* 2009;33 (suppl 1):37-42.
15. Martuzzi M, Biggeri A, Terracini B, Bertollini R. Ambiente e stato di salute nella popolazione delle aree ad alto rischio di crisi ambientale in Italia. *Epidemiol Prev* 2002; 26(suppl):1-53.
16. Fano V, Cernigliaro A, Scondotto S, et al. Mortalità (1995-2000) e ricoveri ospedalieri (2001-2003) nell'area industriale di Gela. *Epidemiol Prev* 2006;30:27-32.
17. Cernigliaro A, Pollina Addario S, Cesaroni G, Fano V, Fantaci G, Tavormina E, Marras A, Forastiere F, Perucci CA, Scondotto S. *Stato di salute nelle aree a rischio ambientale della Sicilia. dell'Osservatorio Epidemiologico Regionale*. Palermo: Regione Siciliana; 2008. (Supplemento monografico *Notiziario OE* luglio 2008).
18. Pasetto R, Biggeri A, Comba P, Pirastu R. Mortalità nella coorte dei lavoratori del petrolchimico di Gela 1960-2002. *Epidemiol Prev* 2007;31(1):39-45.
19. Pasetto R, Comba P, Pirastu R. Lung cancer mortality in a cohort of workers in a petrochemical plant: occupational or residential risk? *Int J Occup Environ Health* 2008;14(2):124-8.

20. Pasetto R, Saitta P, Bracci C. Sviluppo di un'indagine epidemiologica in un sito inquinato: il contributo imprevisto della sociologia e della medicina legale. *Epidemiol Prev* 2008;32(6):325-8.
21. Pasetto R, Pirastu R, Zona A, Comba P. Studio della componente occupazionale e residenziale del rischio nella coorte dei lavoratori del petrolchimico di Gela. *Epidemiol Prev* 2009;33(suppl 1):79-83.
22. Signorino G, Pasetto R, Gatto E, Mucciardi M, La Rocca M, Mudu P. Gravity models to classify commuting vs. resident workers. An application to the analysis of residential risk in a contaminated area. *Int J Health Geograph* 2011;10(1):11.
23. Comba P, Bruno C, Fazzo L, Pasetto R, Zona A. Occupational and residential cohorts. In: Terracini B, Mudu P, Martuzzi M (Ed.). *Human health in areas with local industrial contamination. Challenges and perspectives, with examples from Sicily*. WHO Europe, Copenhagen 2011. (in corso di stampa).
24. Checkoway H, Pearce N, Kriebel D. *Research methods in occupational epidemiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2004.
25. Pirastu R, Marinaccio A, Pasetto R. Residenza in prossimità di industrie petrolchimiche: componente ambientale e occupazionale del rischio cancerogeno. In: Comba P, Bianchi F, Iavarone I, Pirastu R (Ed.). *Impatto sulla salute dei siti inquinati: metodi e strumenti per la ricerca e le valutazioni*. Roma.; Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/50). p. 189-96.
26. Blair A, Stewart P, Lubin JH, Forastiere F. Methodological issues regarding confounding and exposure misclassification in epidemiological studies of occupational exposures. *Am J Ind Med* 2007; 50:199-207.

# BIOMONITORAGGIO DI PERFLUOROOTTANOSULFONATO E ACIDO PERFLUOROOTTANOICO NELLA POPOLAZIONE GENERALE ITALIANA

Anna Maria Ingelido

*Reperto Chimica tossicologica, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

I composti organici perfluorurati (*PerFluorinated Compounds*, PFC) sono sostanze chimiche costituite da un gruppo funzionale di varia natura legato a una catena di atomi di carbonio (di differente lunghezza, lineare o ramificata) in cui tutti gli atomi di idrogeno sono sostituiti da atomi di fluoro. Questa struttura conferisce ai PFC proprietà chimico-fisiche particolari che li rendono particolarmente utili in campo industriale.

I PFC hanno un basso punto di ebollizione e una debole tensione superficiale, sono sostanze chimiche estremamente resistenti al calore e agli acidi con caratteristiche sia idrofile che lipofile. Grazie a queste proprietà, a partire dal loro sviluppo alla fine degli anni '40, le sostanze chimiche fluorurate sono state usate in quantità sempre maggiore per creare liquidi inerti a bassa tensione superficiale (quindi molto spalmabili) o superfici solide con proprietà particolari (in genere antiaderenti). I PFC sono stati utilizzati come emulsionanti e surfattanti in prodotti commerciali per la pulizia di tappeti, pelle, tappezzeria, come componenti inerti nei pesticidi, nei contenitori per cibo, nelle padelle antiaderenti, nelle pellicole fotografiche, negli shampoo e dentifrici, nelle chiusure lampo e nelle schiume antincendio (OECD, 2002; EFSA, 2008a).

A causa delle loro proprietà chimico-fisiche e in particolare alla alta energia del legame carbonio-fluoro, i PFC sono sostanze stabili e chimicamente inerti resistenti all'idrolisi, alla fotolisi, alla biodegradazione. I PFC a catena lunga possono degradare dando luogo a PFC di peso molecolare inferiore. Fra questi prodotti di degradazione ci sono il perfluorottanosulfonato (PFOS) e l'acido perfluorottanoico (PFOA) che sono i due composti più noti e di maggior interesse in campo scientifico e regolatorio.

Il PFOS è stato ampiamente utilizzato tal quale (es. nella formulazione delle schiume anti incendio) ed è il prodotto di degradazione di altri composti chimici perfluorurati utilizzati in prodotti per il trattamento di stoffe e tappeti e formulazioni di pesticidi (3M, 2003).

Il PFOA è stato usato sotto forma di sale di ammonio principalmente come surfattante nella preparazione dei fluoropolimeri tra cui il politetrafluoroetilene (PTFE) utilizzati in varie applicazioni industriali (OECD, 2007). Anche il PFOA è il prodotto di degradazione di polimeri utilizzati nelle schiume anti incendio e nei prodotti protettivi per tappeti, stoffe, pelle e carta (Prevedouros *et al.*, 2006).

PFOS e PFOA sono sostanze persistenti e presenti a livello globale nell'ambiente, nel biota e nell'uomo (Paul *et al.*, 2009). L'uomo è esposto a queste sostanze attraverso varie fonti. Una fonte espositiva molto importante, probabilmente la principale, è rappresentata dagli alimenti, compresa l'acqua potabile (EFSA, 2008a). La contaminazione del cibo può essere di origine ambientale o dovuta alle modalità di conservazione e preparazione dei cibi per contatto con contenitori o utensili che possono rilasciare PFC (Begley *et al.*, 2005; Tittlemier *et al.*, 2006;

Renner, 2007). Altra via espositiva importante è l'inquinamento atmosferico degli ambienti chiusi: l'inalazione o ingestione di polveri può contribuire notevolmente all'esposizione totale (Tittlemier *et al.*, 2007).

Studi tossicologici su animali hanno dimostrato che queste sostanze sono epatotossiche, cancerogene e immunotossiche e hanno effetti negativi sullo sviluppo e possibili effetti negativi sulla riproduzione (EFSA, 2008a; EC, 2010). Gli studi epidemiologici sull'uomo sono ancora piuttosto limitati, ma hanno evidenziato che un'elevata esposizione a queste sostanze può avere conseguenze dannose per la salute, soprattutto a carico della tiroide (EFSA, 2008a).

La presenza e persistenza nell'ambiente a livello globale associate alle proprietà tossiche rendono PFOS e PFOA oggetto dell'attenzione degli strumenti regolatori internazionali che si occupano di inquinanti organici persistenti (*Persistent Organic Pollutants*, POP), primo fra tutti la Convenzione di Stoccolma sui POP. Il PFOS è stato recentemente incluso nella Convenzione poiché risponde ai criteri per poter essere classificato POP ovvero è altamente persistente, è presente a livello globale nell'ambiente, possiede un'elevata tendenza al bioaccumulo ed è tossico (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2009). Inoltre l'Unione Europea con la Direttiva 2006/122/EC ha posto restrizioni sul commercio e l'uso del PFOS e ha indicato la necessità di monitorare le attività di valutazione del rischio relative al PFOA (EU, 2006). In questo contesto è di grande importanza valutare l'entità dell'esposizione umana a tali sostanze e il biomonitoraggio umano rappresenta lo strumento più efficace in quanto fornisce informazioni sulla dose interna del contaminante, risultante da tutte le possibili vie e fonti espositive.

Lo studio qui presentato è parte di una serie di attività intraprese dall'Istituto Superiore di Sanità insieme al Ministero dell'Ambiente per caratterizzare l'esposizione umana ai POPs e ha come obiettivo specifico la caratterizzazione dell'esposizione della popolazione generale italiana a PFOS e PFOA.

## Materiali e metodi

### Partecipanti

Lo studio è stato condotto su campioni di sangue raccolti nel 2008 da 230 partecipanti di età compresa fra i 20 e i 65 anni provenienti da due città italiane: Roma, Centro Italia (182 partecipanti) e Brescia, Nord Italia (48 partecipanti). Sono stati reclutati 121 uomini e 109 donne suddivisi in tre fasce di età: 20-35 anni (62 partecipanti, 19 uomini e 43 donne), 36-50 anni (94 partecipanti, 60 uomini e 34 donne) e 51-65 anni (74 partecipanti, 42 uomini e 32 donne). Tutte le donne arruolate non dovevano aver allattato negli ultimi 15 anni. Prima del prelievo tutti i partecipanti hanno firmato un modulo di consenso informato e compilato un questionario atto a raccogliere informazioni su abitudini alimentari, storia medica e possibili fonti di esposizione specifiche a PFC.

### Analisi

Il metodo analitico utilizzato è stato adattato da un metodo precedentemente pubblicato (Inoue *et al.*, 2004) ed è riportato nel dettaglio in Ingelido *et al.*, 2010.

Sottocampioni di circa 250 µL di siero umano addizionati di standard interni marcati sono stati estratti con acetonitrile in tubo da centrifuga. Dopo separazione la fase organica è stata ridotta in volume in un sistema di evaporazione per campioni multipli (Multivapor Buchi) e trasferito in *vial* da 300 µL per essere sottoposto ad analisi strumentale. L'analisi strumentale è

stata condotta in HPLC-MS/MS con il metodo della diluizione isotopica. La qualità dell'analisi è stata verificata analizzando insieme ai campioni bianchi e campioni di controllo.

## Elaborazione statistica

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software Statistica 8.0. La valutazione delle relazioni fra le concentrazioni ematiche di PFOS e PFOA e sesso ed età dei partecipanti è stata effettuata tramite l'uso di test non-parametrici (Test della Mediana, *Mann-Whitney U test*, *Spearman Test*).

## Risultati e discussione

I risultati dell'analisi di PFOS e PFOA nei gruppi di popolazione generale italiana coinvolti nello studio sono riassunti in Tabella 1. I valori mediani di concentrazione riscontrati nel siero dei partecipanti sono pari a 6,31 ng/g (25°-75° percentile: 4,18-8,43 ng/g) per il PFOS e 3,59 ng/g (25°-75° percentile: 2,51-5,08 ng/g) per il PFOA. I due contaminanti sono stati determinati nel siero di tutti i 230 partecipanti seppure con una variabilità notevole fra il minimo e il massimo livello di concentrazione, pari a 2-3 ordini di grandezza (0,06-29,6 ng/g per il PFOS e 0,22-51,9 ng/g per il PFOA).

**Tabella 1. Concentrazioni ematiche (ng/g) di perfluorottano sulfonato (PFOS) e acido perfluorottanoico (PFOA) in gruppi della popolazione generale italiana<sup>a</sup>**

Caratteristica dei partecipanti	n.	M	MG	MA (DS)	Min-Max	10°P	25°P	75°P	90°P
<b>PFOS</b>									
Tutti	230	6,31	5,77	6,86 (3,93)	0,06-29,6	2,74	4,18	8,43	12,38
<i>Sottogruppi</i>									
Uomini	121	7,21	7,32	8,06 (3,58)	1,24-17,9	4,27	5,62	9,60	14,51
Donne	109	4,82	4,43	5,53 (3,89)	0,06-29,6	1,88	2,88	7,10	8,96
Età 20-35	62	4,46	4,05	5,13 (3,4)	0,06-16,4	1,86	2,80	6,54	— <sup>b</sup>
Età 36-50	94	6,67	5,84	6,63 (3,15)	0,71-15,7	2,86	4,35	8,08	10,84
Età 51-65	74	7,25	7,62	8,61 (4,53)	1,24-29,6	4,22	5,77	10,35	—
<b>PFOA</b>									
Tutti	230	3,59	3,32	4,15 (3,79)	0,22-51,9	1,71	2,51	5,08	6,92
<i>Sottogruppi</i>									
Uomini	121	4,05	3,64	4,72 (4,80)	0,22-51,9	2,03	2,91	5,93	7,22
Donne	109	2,85	3,00	3,52 (2,03)	0,31-9,73	1,56	2,15	4,50	6,90
Età 20-35	62	2,87	2,82	3,34 (1,81)	0,25-9,11	1,56	2,15	4,50	— <sup>b</sup>
Età 36-50	94	3,24	2,85	3,57 (1,95)	0,22-8,10	1,35	2,24	4,75	6,63
Età 51-65	74	4,50	4,61	5,56 (5,87)	1,63-51,9	2,52	3,24	6,61	—

(a) Valori arrotondati a tre cifre.

(b) Sono riportati soltanto i percentili calcolati su un numero sufficiente ( $N(1-p) \geq 8$ ; (EFSA, 2008b) di soggetti (N).  
M: Mediana; MG: Media Geometrica; MA: Media Aritmetica; P: Percentile; DS: Deviazione Standard

I livelli di entrambi i contaminanti sono risultati più alti negli uomini che nelle donne. Il test U di *Mann-Whitney* è stato applicato all'intero set di dati e ai sottogruppi definiti dalle tre classi di età per vedere se tale differenza fosse significativa. Per entrambi i contaminanti le differenze

fra i due sessi sono risultate statisticamente significative (Tabella 2) nelle due classi di età bassa ( $p << 0,001$ ) e intermedia ( $p < 0,05$ ) e nell'intero dataset ( $p << 0,001$ ).

**Tabella 2. Concentrazioni ematiche (ng/g) di perfluorottano sulfonato (PFOS) e acido perfluorottanoico (PFOA) riportate per età e sesso in gruppi della popolazione generale italiana<sup>a</sup>**

Caratteristica dei partecipanti	Uomini				Donne				p <sup>b</sup>
	n.	Mediana	25°P	75°P	n.	Mediana	25°P	75°P	
<b>PFOS</b>									
Tutti	121	7,21	5,62	9,60	109	4,82	2,88	7,10	<<0,001
Età 20-35	19	6,50	5,20	8,43	43	3,15	2,35	5,50	<<0,001
Età 36-50	60	7,10	5,38	8,60	34	4,55	2,86	7,38	<<0,001
Età 51-65	42	7,97	6,12	12,29	32	7,02	5,08	8,84	0,1 <sup>c</sup>
<b>PFOA</b>									
Tutti	121	4,05	2,91	5,93	109	2,85	2,15	4,50	<<0,001
Età 20-35	19	3,64	2,89	5,08	43	2,56	1,88	4,15	0,02
Età 36-50	60	4,04	2,56	5,38	34	2,74	1,96	3,32	<<0,001
Età 51-65	42	4,98	3,34	6,61	32	4,38	2,86	6,75	0,5 <sup>c</sup>

(a) Valori arrotondati a tre cifre.

(b) Mann-Whitney U test.

(c) Non significativo a  $p < 0,05$ .

Questo risultato è in linea con quanto osservato in altri studi effettuati su popolazioni residenti in altri paesi europei ed extraeuropei (Olsen *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2004; Calafat *et al.*, 2007a; Calafat *et al.*, 2007b; Toms *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2006; Midasch *et al.*, 2006; Wilhelma *et al.*, 2009). Tale differenza di concentrazione fra individui di sesso diverso potrebbe essere legata a differenze nell'esposizione o nei meccanismi di metabolismo ed escrezione. L'ipotesi formulata da altri autori (Fei *et al.*, 2007; Kärman *et al.*, 2007; So *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2008) che la gravidanza e l'allattamento potrebbero in parte spiegare i livelli più bassi riscontrati nelle donne non può nel nostro caso essere sostenuta in quanto la maggior parte (65%) delle partecipanti erano nullipare al momento del prelievo e nessuna aveva allattato negli ultimi 15 anni. Una seconda ipotesi formulata da un gruppo di ricercatori giapponesi (Harada *et al.*, 2005) riguardante un'altra via di eliminazione sesso specifica, ovvero il ciclo mestruale, meglio si presta all'interpretazione dei nostri risultati in quanto la perdita di significatività nella differenza genere correlata di concentrazioni di PFC nei partecipanti di età superiore ai 51 anni potrebbe essere spiegata con la cessazione della via di eliminazione presente nelle sole donne.

Le concentrazioni di entrambi i contaminanti hanno mostrato un andamento crescente attraverso le tre classi di età. Il test di Spearman ha mostrato un alto livello di correlazione (PFOS: Spearman  $r = 0,35$ ,  $p << 0,001$ ; PFOA: Spearman  $r = 0,27$ ,  $p << 0,001$ ) fra le concentrazioni ematiche e le età dei partecipanti per tutti e due i contaminanti. Applicando il test della Mediana all'intero set di dati e ai due sottogruppi definiti dal sesso, le differenze sono risultate statisticamente significative (Tabella 3) sia nell'intero gruppo di partecipanti ( $p << 0,001$ ), sia nelle donne ( $p < 0,005$ ). L'aumento delle concentrazioni ematiche di PFC con l'età è già stato osservato in altri studi (Fromme *et al.*, 2007; Toms *et al.*, 2009), è caratteristico anche di altre famiglie di contaminanti organici persistenti (CDC, 2010) ed è probabilmente conseguenza della persistenza ambientale e capacità di bioaccumulo di queste sostanze (Lau *et al.*, 2007; Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2001) associate alle

condizioni di esposizione costante della popolazione. In questo studio tale aumento della concentrazione con l'età è più evidente nelle donne che negli uomini ed è probabilmente associato alla capacità delle donne con età inferiore ai 50 anni di eliminare meglio questi contaminanti.

Il test di Spearman applicato all'intero set di dati per ricercare la presenza di un'eventuale correlazione fra i livelli di PFOS e quelli di PFOA ha mostrato che le concentrazioni ematiche dei due contaminanti sono fortemente correlate (Spearman  $r = 0.42$ ,  $p < 0,001$ ). Anche questo risultato trova ampio riscontro nella letteratura internazionale (Calafat *et al.*, 2007a; Ericson *et al.*, 2007; Kannan *et al.*, 2004; Wilhelma *et al.*, 2009) ed è probabilmente dovuto alla contemporanea presenza dei due contaminanti o di loro precursori in molte fra le principali fonti o vie espositive (cibo, contenitori per cibo, acqua potabile, polveri domestiche) (EFSA, 2008a).

**Tabella 3. Concentrazioni ematiche (ng/g) di perfluorooctano sulfonato (PFOS) e acido perfluorooctanoico (PFOA) riportate per sesso ed età in gruppi della popolazione generale italiana<sup>a</sup>**

Caratteristica dei partecipanti	Età 20-35			Età 36-50			Età 51-65			p <sup>b</sup>
	n.	M	25°-75°P	n.	M	25°-75°P	n.	M	25°-75°P	
<b>PFOS</b>										
Tutti	62	4,46	2,80-6,54	94	6,67	4,35-8,08	74	7,25	5,77-10,35	<<0,001
Uomini	19	6,50	5,20-8,43	60	7,10	5,38-8,59	42	7,97	6,12-12,29	0,33 <sup>c</sup>
Donne	43	3,15	2,35-5,50	34	4,55	2,86-7,38	32	7,02	5,08-8,84	<<0,001
<b>PFOA</b>										
Tutti	62	2,87	2,15-4,50	94	3,24	2,24-4,75	74	4,50	3,24-6,61	<<0,001
Uomini	19	3,64	2,89-5,08	60	4,04	2,56-5,38	42	4,98	8,34-6,62	0,45 <sup>c</sup>
Donne	43	2,56	1,88-4,15	34	2,74	1,96-3,32	32	4,38	2,86-6,74	0,003

(a) Valori arrotondati a tre cifre.

(b) Test della Mediana.

(c) Non significativo a  $p < 0.05$ .

M: Mediana; P: Percentile

Le concentrazioni ematiche di PFOS e PFOA rilevate in questo studio sono riportate in Tabella 4 accanto a quelle misurate in altri Paesi per valutare come i livelli espositivi italiani si collocano nel panorama internazionale. Sebbene il confronto sia reso problematico da differenze inevitabilmente presenti nelle metodologie seguite nei diversi studi, le concentrazioni ematiche di PFOS e PFOA rilevate nei campioni italiani sembrano collocarsi fra le più basse a livello mondiale.

I livelli di PFOS determinati in questo studio sono peraltro coerenti con l'unico altro dato relativo a campioni italiani (50 adulti, 42 uomini e 8 donne) reperibile in letteratura (Kannan *et al.*, 2004); per quanto riguarda il PFOA non è possibile fare un confronto analogo in quanto nel lavoro sopra citato è risultato sotto al limite di quantificazione. Un'interpretazione esaustiva del dato italiano più basso rispetto a quelli di altri Paesi è resa difficile dalla complessità del quadro espositivo caratteristico di queste sostanze e soprattutto dalla scarsa conoscenza dei contributi delle varie vie e fonti di esposizione; è tuttavia possibile formulare delle ipotesi legate allo stile di vita.

In Italia è molto contenuto l'uso di tappeti o moquette che è invece stato identificato come una componente molto importante nel determinare l'inquinamento indoor (Tittlemeier *et al.*, 2007; Trudel *et al.*, 2008).

Tabella 4. Concentrazioni di PFOS e PFOA (ng/mL) in gruppi della popolazione generale di Paesi europei ed extraeuropei

Paese	Anno di campionamento	Tipo di campione	PFOS	PFOA	Numero e caratteristiche dei partecipanti	Referenze
<b>Paesi europei</b>						
Belgio	1998-2000	siero	10,4 <sup>a</sup> 17,6 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup> 4,3 <sup>a</sup>	4 donne 16 uomini	Kannan <i>et al.</i> 2004
Germania	2003	plasma	13 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup>	11 donne incinte	Midasch <i>et al.</i> 2007
Germania	2003-2004	plasma	22,3 <sup>a</sup> 27,1 <sup>a</sup> 19,9 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup> 8,3 <sup>a</sup> 5,8 <sup>a</sup>	105 adulti 51 uomini 54 donne	Midasch <i>et al.</i> 2006
Italia	2001	siero	3,5 <sup>a</sup> 4,2 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup> <3 <sup>a</sup>	8 donne 42 uomini	Kannan <i>et al.</i> 2004
Norvegia	2004	plasma	20 <sup>a</sup>	4,4 <sup>a</sup>	326 donne	Rylander <i>et al.</i> 2010
Polonia	n.s	sangue <sup>b</sup>	10,4-168 <sup>c</sup>	2,4-17,4	60 adulti	Falandysz <i>et al.</i> 2006
Polonia	2003	sangue <sup>b</sup>	67,6 <sup>a</sup> 81,8 <sup>a</sup>	46,4 <sup>a</sup> 36,8 <sup>a</sup>	15 donne 10 uomini	Kannan <i>et al.</i> 2004
Svezia	1997-2000	sangue <sup>b</sup>	24,2 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	66 adulti	Karman <i>et al.</i> 2004
<b>Paesi extraeuropei</b>						
Australia	2006-2007	sangue <sup>b</sup>	30,4 <sup>d</sup> 41,4 <sup>d</sup> 29,8 <sup>d</sup> 49,2 <sup>d</sup> 37,2 <sup>d</sup>	12,8 <sup>d</sup> 13,8 <sup>d</sup> 9 <sup>d</sup> 13,8 <sup>d</sup> 11,8 <sup>d</sup>	2420 partecipanti, 84 pools uomini (Età 31-45) donne (Età 31-45) uomini (Età 46-60) donne (Età 46-60)	Toms <i>et al.</i> 2009
Brasile	2003	sangue <sup>b</sup>	16,8 <sup>a</sup> 25,4 <sup>a</sup>	<40 <sup>a</sup> <40 <sup>a</sup>	17 donne 10 uomini	Kannan <i>et al.</i> 2004
Canada	-	sangue <sup>b</sup>	57,6 <sup>d</sup>	6,8 <sup>d</sup>	56 adulti	Yeung <i>et al.</i> 2008
Canada	2004-2005	siero	16,6 <sup>a</sup>	2,13 <sup>a</sup>	101 donne incinte	Kuklenyik <i>et al.</i> , 2004
Cina (Shenyang)	2004	sangue <sup>b</sup>	112,6 <sup>d</sup>	4 <sup>d</sup>	5 adulti	Yeung <i>et al.</i> 2008
Cina (Nanjing)			2,8 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	10 adulti	

segue

continua

Paese	Anno di campionamento	Tipo di campione	PFOS	PFOA	Numero e caratteristiche dei partecipanti	Referenze
Colombia	2003	sangue <sup>b</sup>	14,6 <sup>a</sup>	11,2 <sup>a</sup>	25 donne	Kannan et al. 2004
			16,2 <sup>a</sup>	11,8 <sup>a</sup>	31 uomini	
Corea	2003	sangue <sup>b</sup>	22,6 <sup>a</sup>	61,8 <sup>a</sup>	25 donne	Kannan et al. 2004
			43,4 <sup>a</sup>	53,6 <sup>a</sup>	25 uomini	
Giappone	2002	siero	18,3 <sup>a</sup>	12,3 <sup>a</sup>	13 donne	Kannan et al. 2004
			12,4 <sup>a</sup>	<6,8 <sup>a</sup>	25 uomini	
Giappone	2003	sangue <sup>b</sup>	9,8-35,2 <sup>c</sup>	<1-4,6 <sup>c</sup>	15 donne incinte	Inoue et al. 2004
Giappone (Kyoto)	2003	siero	13,8 <sup>e</sup>	7,1 <sup>e</sup>	26 donne	Harada et al. 2004
Giappone (Miyang)	2000	siero	28,1 <sup>e</sup>	12,4 <sup>e</sup>	28 uomini	Kannan et al. 2004
			3,5 <sup>e</sup>	2,8 <sup>e</sup>	23 donne	
			5,7 <sup>e</sup>	3,3 <sup>e</sup>	32 uomini	
India	2000	siero	2,5 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	11 donne	Kannan et al. 2004
			1,3 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>	34 uomini	
Malesia	2004	sangue <sup>b</sup>	15,4 <sup>a</sup>	<20 <sup>a</sup>	16 uomini	Kannan et al. 2004
			26,2 <sup>a</sup>	<20 <sup>a</sup>	7 donne	
USA (Michigan)	2000	siero	28,9 <sup>a</sup>	4,4 <sup>a</sup>	46 donne	Kannan et al. 2004
			26,2 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a</sup>	29 uomini	
USA (Atlanta)	2003	siero	53,66 <sup>d</sup>	4,22 <sup>d</sup>	10 donne	Kuklennyk et al. 2004
			57,97 <sup>d</sup>	2,89 <sup>d</sup>	10 uomini	
USA (Kentucky)	2002	sangue <sup>b</sup>	162 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>	11 donne	Kannan et al. 2004
			144 <sup>a</sup>	76,2 <sup>a</sup>	19 uomini	
USA (NY City)	2002	plasma	42 <sup>a</sup>	25,2 <sup>a</sup>	70 adulti	Kannan et al. 2004
USA (Seattle)	2000-2001	sangue <sup>b</sup>	60,4 <sup>a</sup>	8,4 <sup>a</sup>	238 adulti	Olsen et al. 2004
USA	1999-2000	siero	30,4 <sup>e</sup>	5,2 <sup>e</sup>	1562 adulti	Calafat et al. 2007
USA	2000-2001	sangue <sup>b</sup>	71,6 <sup>a</sup>	9,4 <sup>a</sup>	645 adulti	Olsen et al. 2003
USA	2003-2004	siero	20,7	3,9	2094 adulti	Calafat et al. 2007
USA	2005-2006	siero	15,5	3,5	—	Lau, 2009

<sup>a</sup> Mediana<sup>b</sup> Le concentrazioni di PFOS and PFOA rilevate nel sangue sono state convertite in concentrazioni nel siero moltiplicando per 2 (Kannan et al., 2004).<sup>c</sup> Range<sup>d</sup> Media aritmetica<sup>e</sup> Media geometrica

Anche le abitudini alimentari potrebbero giocare un ruolo importante nel limitare l'esposizione a PFC rilasciati dai contenitori per cibi in quanto in Italia è ancora poco diffusa la tendenza a consumare pasti veloci fuori casa ed è piuttosto limitato rispetto ad altri paesi il consumo di fast food (ISTAT, 2010) e di alimenti pronti o che prevedono la cottura nel contenitore di confezionamento. Quest'ultima ipotesi non è facilmente verificabile in quanto mancano dati relativi alle concentrazioni di queste sostanze nelle varie categorie alimentari che renderebbero più agevole quantificare l'influenza delle abitudini alimentari sull'intake di PFC.

Da quanto detto finora risulta evidente che le informazioni disponibili su questi contaminanti sono ancora piuttosto limitate ed è necessario approfondire lo stato attuale delle conoscenze sia per quanto riguarda vie e fonti espositive che i meccanismi di metabolismo ed escrezione. A questo proposito i dati raccolti in questo studio consentono di collocare l'Italia nel quadro espositivo internazionale a queste sostanze, tuttavia a nostro parere, ulteriori studi di biomonitoraggio umano sono necessari per rafforzare le informazioni acquisite e arricchirle con dati provenienti da altre zone del Paese, anche caratterizzate da esposizione di tipo potenzialmente diverso, come ambienti rurali o siti inquinati.

## Bibliografia

- 3M. Health and Environmental Assessment of Perfluorooctane Sulfonic Acid and its Salts. *USEPA docket AR-226-1486*. US Environmental Protection Agency, Washington, DC; 2003
- Begley TH, White K, Twarosi ML, Neches R, Walker RA. Perfluorochemicals: potential sources of and migration from food packaging. *Food Addit Contam* 2005;22:1023-31.
- Calafat A, Kulenyik Z, Reidy J, Caudill SP, Tully J, Needham L. Serum concentration of 11 Polyfluoroalkyl Compounds in the US population: data from the National health and nutrition examination survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Sci Technol* 2007;41:2237-42.
- Calafat A, Wong LY, Kulenyik Z, Reidy J, Needham L. Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2007;115:1596-602.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Chemical information on Dioxin-like chemicals: Polychlorinated dibenzo-pdioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar and mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls. National Report on human exposure to environmental chemicals*. Atlanta, Georgia: CDC; 2010. Disponibile all'indirizzo: [http://www.cdc.gov/exposurereport/data\\_tables/DioxinLikeChemicals\\_ChemicalInformation.html](http://www.cdc.gov/exposurereport/data_tables/DioxinLikeChemicals_ChemicalInformation.html); ultima consultazione 22/9/11.
- EFSA, 2008b. Guidance document for the use of the concise European food consumption database in exposure assessment. *EFSA/DATEX/2008/01*. Parma (Italy), 17 March 2008. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/datex/docs/datexfooddbguidance.pdf>; ultima consultazione 22/9/11.
- EFSA. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. (Question N\_EFSA-Q-2004-163). *The EFSA J* 2008a;653:1-131. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/653.pdf>; ultima consultazione 22/9/11.
- Ericson I, Gómez M, Nadal M, Van Bavel B, Lindström G, Domingo JL. Perfluorinated chemicals in blood of residents in Catalonia (Spain) in relation to age and gender: a pilot study. *Environ Int* 2007;33:616-23.
- EU. Direttiva 2006/122/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 dicembre 2006, che modifica, per la trentesima volta, la direttiva 76/769/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alle restrizioni in

- materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi (perfluorooctano solfonati). *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* 372 del 27-12-2006.
- European Commission, DG Enterprise and Industry. *European Commission: Final report on risks from the industrial use of PFOA and APFO*. Delft, The Netherlands: RPS Advies B.V.; 2010.
- Falandysz J, Taniyasu S, Gulkowska A, Yamashita N, Schulte-Oehlmann U. Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic Coast? *Environ Sci Technol* 2006;40(3):748-51.
- Fei C, McLaughlin JK, Tarone RE, Olsen J. Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish national birth cohort. *Environ. Health Perspect* 2007;115(11):1677-82.
- Fromme H, Midasch O, Twardella D, Angerer J, Boehmer S, Liebl B. Occurrence of perfluorinated substances in an adult German population in southern Bavaria. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80:313-9.
- Harada K, Inoue K, Morikawa A, Yoshinaga SN, Koizumi A. Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ Res* 2005;99:253-61.
- Harada K, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Watanabe T, Sasaki S, Kamiyama S, Koizumi A. The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years. *J Occup Health* 2004;46:141-7.
- Ingelido AM, Marra V, Abballe A, Valentini S, Iacovella N, Barbieri PG, Porpora MG, Di Domenico A, De Felip E. Perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoic acid exposures of the Italian general population. *Chemosphere* 2010;80(10):1125-30.
- Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, Uno A, Saijo Y, Sata F, Yoshimur Y, Kishi R, Nakazawa H. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ. Health Perspect* 2004;112(11):1204-7.
- ISTAT. *Annuario Statistico Italiano 2010*. Roma: Istituto Nazionale di Statistica; 2010.
- Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Fillmann G, Kumar KS, Loganathan BG, Mustafa AM, Olivero J, Van Wouwe N, Yang, JH, Aldous KM. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ Sci Technol* 2004;38:4489-95.
- Kärman A, Ericson I, Van Bavel B, Darnerud PO, Aune M, Glynn A, Lignell S, Lindstrom G. Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996-2004, in Sweden. *Environ. Health Perspect* 2007;115(2):226-30.
- Kärman A, Van Bavel B, Hardell L, Lindström G. Perfluoroalkylated compounds in whole blood and plasma from the Swedish population. *Organohalogen Comp* 2004;66:4058-62.
- Kuklennyik Z, Reich JA, Tully JS, Needham LL, Calafat AM. Automated solid-phase extraction and measurement of perfluorinated organic acids and amides in human serum and milk. *Environ Sci Technol* 2004;38:3698-704.
- Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 2007;99:366-94.
- Lau C. Toxicology of perfluoroalkyl acids. In: *Proceedings of 2009 National Forum on Contaminants in fish*. Section II Biosketches, Abstracts, Presentations, and Questions and Answers. Disponibile all'indirizzo: [http://www.epa.gov/waterscience/fish/forum/2009/section2\\_2009.pdf](http://www.epa.gov/waterscience/fish/forum/2009/section2_2009.pdf)
- Midasch O, Schettgen T, Angerer J. Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population. *Int J Environ Health* 2006;209:489-96.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). *Co-operation on existing chemicals. Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts*. OECD; 2002 (ENV/JM/RD 17/FINAL).

- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). *Report of an OECD Workshop on Perfluorocarboxylic Acids (PFCAs) and Precursors*. Stockholm: OECD; 2007. (ENV/JM/MONO(2007)11).
- Olsen GW, Church TR, Larson EB, Belle GV, Lundberg JK, Hansen KJ, Burris JM, Mandel JH, Zobel LR. Serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in an elderly population from Seattle, Washington. *Chemosphere* 2004;54(11):1599-611.
- Olsen GW, Church TR, Miller JP, Burris JM, Hansen KJ, Lundberg JK, Armitage JB, Herron RM, Medhdizadehkashi Z, Nobiletti JB, O'Neill EM, Mandel JH, Zobel LR. 2003. Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors. *Environ Health Perspect* 2003;11:1892-901.
- Paul AG, Jones KC, Sweetman AJ. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environ Sci Technol* 2009;43:386-92.
- Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol* 2006;40:32-44.
- Renner R. PFOA in people. Food wrappers may be an important, overlooked source of perfluorochemicals in humans. *Environ Sci Technol* 2007;41(13):4497-500.
- Rylander C, Sandanger TM, Frøyland L, Lund E. Dietary patterns and plasma concentrations of perfluorinated compounds in 315 Norwegian women: The NOWAC Postgenome Study. *Environ Sci Technol* 2010;44:5225-32.
- So MK, Yamashita N, Taniyasu S, Jiang Q, Giesy JP, Chen K, Lam PK. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ Sci Technol* 2006;40(9):2924-9.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *The 9 new POPs under the Stockholm Convention*. Châtelaine: Stockholm Convention; 2009. Disponibile all'indirizzo: <http://chm.pops.int/Programmes/New%20POPs/The%209%20new%20POPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>; ultima consultazione 22/9/11.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *What are POPs?* Châtelaine: Stockholm Convention; 2001. Disponibile all'indirizzo: <http://chm.pops.int/Convention/The%20POPs/tabid/673/language/en-US/Default.aspx>; ultima consultazione 22/9/11.
- Tao L, Kannan K, Wong CM, Arcaro KF, Butenhoff JL. Perfluorinated compounds in human milk from Massachusetts, USA. *Environ Sci Technol* 2008;42:3096-101.
- Tittlemeier SA, Pepper K, Seymour C, Moisey J, Bronson R, Cao XL, Dabeka RW. Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packagings. *J Agric Food Chem* 2007;55:3203-10.
- Tittlemier SA, Pepper K, Edwards L. Concentrations of Perfluorooctanesulfonamides in Canadian total diet study composite food samples collected between 1992 and 2004. *J Agric Food Chem* 2006;54:8385-9.
- Toms LM, Calafat A, Kato K, Thompson J, Harden F, Hobson P, Sjodin A, Jochen A, Mueller F. PolyfluoroalkylChemicals in pooled blood serum from infants, children and adults in Australia. *Environ Sci Technol* 2009;43:4194-9.
- Trudel D, Horowitz L, Wormuth M, Scheringer M, Cousins IT, Hungerbühler K. Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Anal* 2008;28:251-69.
- Wilhelma M, Angerer J, Fromm H, Holzera J. Contribution to the evaluation of reference values for PFOA and PFOS in plasma of children and adults from Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212:56-60.

Yeung LWY, Miyake Y, Taniyasu S, Wang Y, Yu H, So MK, Jiang G, Wu Y, Li J, Giesy JP, Yamashita N, Lam PKS. Perfluorinated compounds and total and extractable organic fluorine in human blood samples from China. *Environ Sci Technol* 2008;42:8140-5.

Yeung LWY, So MK, Jiang GB, Taniyasu S, Yamashita N, Song MY, Wu YN, Li JG, Giesy JP, Guruge KS, Lam PKS. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood samples from China. *Environ Sci Technol* 2006;40:715-20.

# PRESENZA DI METALLI ALLERGENI IN BIGIOTTERIA, PIERCING E COLORI PER TATUAGGI

Giovanni Forte, Francesco Petrucci, Stefano Caimi, Beatrice Bocca  
*Reparto Bioelementi e salute, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

I metalli vengono impiegati in numerose produzioni industriali e sono componenti principali o impurezze in prodotti di largo consumo come nella bigiotteria e piercing, nei cosmetici, nei colori per tatuaggi, negli inchiostri, nelle monete, nelle pelli e prodotti tessili, nei prodotti per la casa. Il più diffuso rischio tossicologico per l'uomo quale consumatore di tali prodotti è quello di sviluppare la Dermatite Allergica da Contatto (DAC). Nella popolazione europea la prevalenza della DAC da Ni, Cr e Co è del 20%, 4% e 7% rispettivamente, e simili percentuali di prevalenza sono state riscontrate negli Stati Uniti (14% per il Ni, 4% per il Cr e 9% per il Co) (1-3). In Italia, uno studio effettuato nel Nord-Est ha evidenziato che su circa 15.000 soggetti affetti da DAC il 24,6% era allergico al Ni, l'8,7% al Cr e il 10,2% al Co (4).

Le categorie più colpite dalla DAC ai metalli sono le donne e la popolazione giovanile (10-20 anni) (5). L'origine della DAC da Ni e Co è principalmente extra-professionale essendo conseguenza della presenza di tali metalli nella bigiotteria e accessori, in prodotti cosmetici (ombretti, mascara, rossetti, fondotinta, detergenti e creme) e in prodotti per la pulizia della casa (saponi, detersivi). La DAC da Cr è per lo più di origine professionale, soprattutto a causa del contatto con i sali di cromo contenuti nel cemento e utilizzati nell'industria tessile per la concia delle pelli (6, 7).

La DAC è una reazione immunitaria che si sviluppa in due fasi. La fase iniziale (fase di sensibilizzazione) è quella della penetrazione del metallo nella pelle. Il metallo si lega alle cellule di Langherans, che sono un tipo di cellule immunitarie della pelle, e da queste lascia la pelle per poi continuare il viaggio attraverso i linfonodi. Da questo punto inizia la proliferazione di linfociti T che possiedono la memoria dell'allergene e che interverranno nel momento in cui si ripresenta l'allergene. Nel momento in cui la sensibilizzazione si è verificata e la reazione dei linfociti T è avvenuta c'è un processo infiammatorio (fase di induzione) che si concretizza con una infiammazione della pelle nel punto di contatto. La fase di induzione si verifica entro 24-96 ore dopo l'esposizione e anche una piccola quantità di metallo può essere sufficiente per provocare lesioni cutanee (8-10).

I sintomi primari della DAC sono arrossamento, aumento della temperatura, gonfiore e dolore nella sede dell'infiammazione; a tali sintomi si può affiancare la comparsa di pustole, papule, vescicole, essudato, secchezza cutanea e sensazione di prurito. Le manifestazioni cutanee sono inizialmente limitate alla sede di contatto ma è frequente la diffusione delle lesioni sia in aree limitrofe che a distanza, fino ad interessare, nei casi più gravi, la quasi totalità della superficie cutanea. La gravità della sintomatologia della DAC può arrecare importanti impedimenti nel normale svolgimento di varie attività professionali (ad esempio, cassieri, parrucchieri, addetti alle pulizie, operai edili e dell'industria tessile). In più, non bisogna dimenticare che le DAC provocate da metalli costituiscono una delle patologie più diffuse tra le casalinghe.

È quindi importante attuare un'efficace prevenzione sia in ambito professionale che extraprofessionale, riducendo il contatto con i metalli allergizzanti ed evitando di conseguenza la comparsa di recidive della dermatite. Questo vuol dire, ad esempio, indossare indumenti protettivi (guanti di cotone), utilizzare creme-barriera protettive e consumare prodotti di bigiotteria e igienico-cosmetici con contenuto controllato di Ni (riconoscibili dal marchio "testati per il Ni"). A tale proposito, la normativa Europea ha regolamentato l'uso di questi metalli nei prodotti destinati al contatto con la pelle. La Direttiva del Consiglio 94/27/CE e la più restrittiva Direttiva della Commissione 2004/96/CE prevedono una limitazione del contenuto totale di Ni nelle leghe (0,05%) e della quantità di Ni rilasciata ( $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$ ) da oggetti metallici in una soluzione simulante il sudore (11, 12). La Direttiva del Consiglio (implementata dalla Direttiva della Commissione 2004/93/CE) vieta l'utilizzo di determinati metalli nelle formulazioni cosmetiche (13, 14). Allo stesso modo, la Risoluzione ResAP (2008)1 del Consiglio d'Europa riporta le massime concentrazioni permesse di metalli, intesi come impurezze, in prodotti che vengono usati per i tatuaggi e per i trucchi permanenti (15).

Allo stato attuale, pur essendo passati alcuni anni dall'emanazione delle direttive sopra citate, la percentuale di DAC da metalli è ancora molto alta. Questo accade perché sul mercato ufficiale esistono moltissimi prodotti (bigiotteria, accessori, colori per tatuaggi, cosmetici, ecc.) che hanno origine e formulazioni diverse, a questi si devono aggiungere tutti quei prodotti venduti da un mercato parallelo e non ufficiale. In entrambi i casi il fattore comune è che nulla o poco si conosce sulla concentrazione dei metalli, sia come costituenti principali che come impurezze, in tali prodotti e sul rischio per la salute del consumatore. Di conseguenza, è indubbia l'importanza di impegnarsi nella raccolta e nell'analisi di dati per creare una base comune di conoscenza sui pericoli legati all'uso di bigiotteria e alla pratica del piercing e del tatuaggio al fine di adottare opportuni programmi di prevenzione (16).

In tale contesto, il nostro gruppo di lavoro ha effettuato recentemente vari studi al fine di valutare il contenuto di Co, Cr e Ni in componenti di bigiotteria, piercing e colori per tatuaggi al fine di porre le basi per una caratterizzazione del rischio per la salute in seguito all'utilizzo prolungato di tali oggetti e prodotti (17-19). Scopi di questi studi erano quelli di evidenziare:

- 1) la cessione di metalli allergeni da leghe per bigiotteria e piercing presenti sul mercato ufficiale e non ufficiale;
- 2) il contenuto dei metalli allergeni nei colori utilizzati per la pratica del tatuaggio;
- 3) la conformità delle leghe e dei colori presenti sul mercato alle norme vigenti (94/27/CE, 2004/96/CE, Risoluzione ResAP (2008)1) che ne limitano l'utilizzo nelle formulazioni;
- 4) la possibilità di un eventuale rischio per il consumatore di sviluppare DAC.

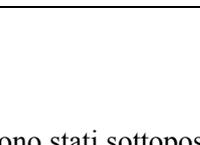
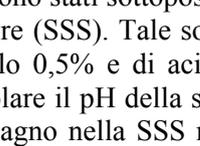
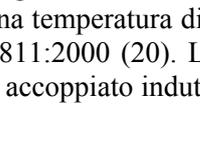
In questo contributo, sono stati riassunti i risultati di tali studi e sono fornite osservazioni per quanto riguarda la sicurezza per la salute derivante dall'uso di tali oggetti e prodotti e per l'implementazione delle norme in materia attualmente vigenti.

## **Bigiotteria**

### **Campioni**

La Tabella 1 mostra i dieci componenti per orecchini selezionati per lo studio. Gli articoli, acquistati in negozi di Roma, sono stati scelti al fine di rappresentare i modelli più venduti (ami semplici, monachelle, clip e perni con fermi). Tutti i componenti sono stati venduti come esenti da Ni ("Nickel free").

Tabella 1. Caratteristiche della bigiotteria campionata sul mercato

Oggetto (n.)		Modello	Rivestimento esterno
1 2 3		amo semplice amo semplice amo semplice	Au Ag nessuno
4		monachella	Au
5		monachella	Ag
6		clip	Au
7		clip	Ag
8		perno con fermo	Ag
9		perno con fermo	Au
10		perno con fermo	Ag

## Metodo

Gli orecchini sono stati sottoposti a prove per verificare il rilascio dei metalli nella Soluzione Simulante il Sudore (SSS). Tale soluzione era composta da una soluzione acquosa di urea allo 0,1%, di NaCl allo 0,5% e di acido lattico allo 0,1%. Una soluzione di NH<sub>3</sub> all'1% è stata utilizzata per regolare il pH della soluzione al valore di 6,5. Ogni campione è stato lasciato per una settimana a bagno nella SSS nel rapporto 1:1 (1 mL di soluzione per 1 cm<sup>2</sup> di superficie dell'oggetto) ad una temperatura di 30°C. I dettagli del metodo di estrazione sono riportati nella norma UNI EN 1811:2000 (20). L'analisi delle SSS è stata effettuata tramite spettrometria di massa con plasma accoppiato induttivamente (SF-ICP-MS) (17).

## Risultati

In Figura 1 sono riportate le quantità di Co, Cr e Ni presenti nella SSS dopo una settimana di estrazione dagli orecchini. La linea orizzontale indica il limite massimo consentito di Ni, ovvero 0,2 µg/cm<sup>2</sup>/settimana, come riportato dalla Direttiva della Commissione 2004/96/CE (11).

I risultati hanno evidenziato che sette oggetti hanno rilasciato Ni in concentrazione (compresa tra 0,02 e 0,19 µg /cm<sup>2</sup>/settimana) inferiore al limite di legge. Tre oggetti hanno rilasciato Ni in quantità superiore al limite di legge.

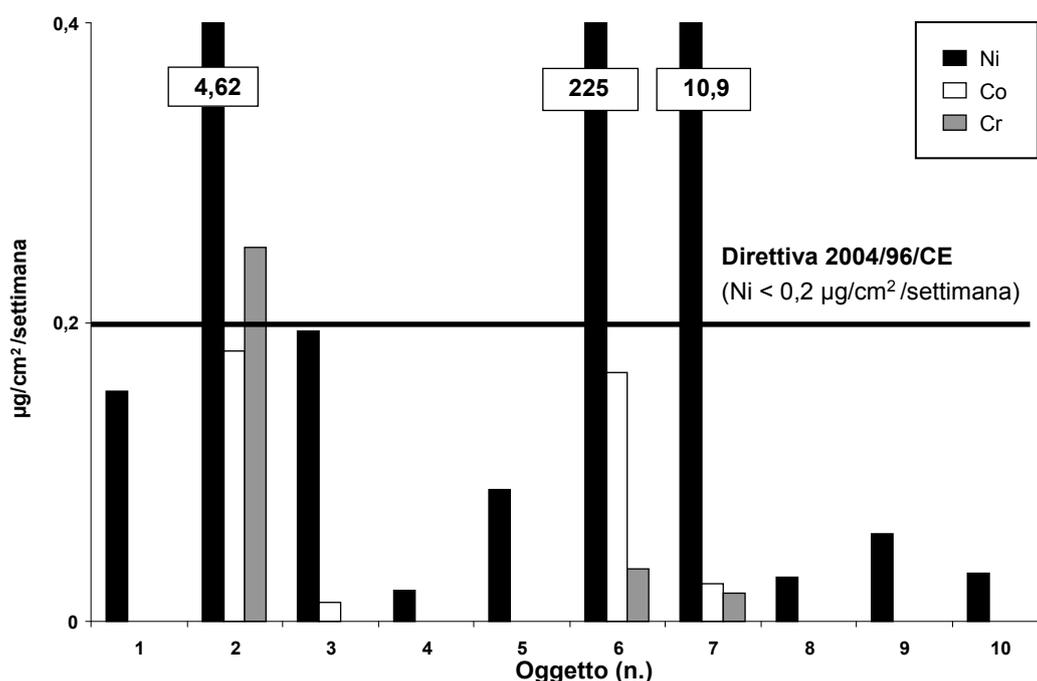


Figura 1. Valori di Co, Cr e Ni rilasciati dai componenti per orecchini

In particolare, il n. 2 (amo semplice rivestito in Ag) ha rilasciato 4,62  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$  di Ni, il n. 6 (clip rivestita in Au) ha ceduto più di 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$  di Ni e il n. 7 (clip rivestita in Ag) ha rilasciato circa 11  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$  di Ni. Dai dati è emerso che, in alcuni casi, i rivestimenti della superficie degli oggetti con Ag o Au sono piuttosto sottili e non uniformi e di conseguenza non riescono a bloccare la cessione del Ni dall'oggetto. Per quanto riguarda Co e Cr, il primo è stato rilasciato da 4 materiali (n. 2, 3, 6 e 7) e il secondo da 3 materiali (n. 2, 6 e 7). Per questi due metalli non esiste alcun limite che regola la loro cessione da oggetti metallici per mezzo di una SSS. Volendo fare comunque riferimento al limite stabilito per il Ni, si osserva che solo in un caso (n. 2) il Cr è rilasciato in quantità superiore (0,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$ ) alla norma. Tra tutti i materiali investigati, i materiali n. 2, 6 e 7 hanno ceduto contemporaneamente tutti e tre i metalli, Co, Cr e Ni, ponendo la base per sensibilizzazioni della pelle, anche crociate dovute al loro effetto sinergico.

## Piercing

### Campioni

La Figura 2 mostra i dieci piercing (per orecchie, labbra, sopracciglia, capezzolo e ombelico), di varie dimensioni e colori, acquistati a Roma per lo studio. In particolare, i piercing n. 1, 2 e 3 erano costituiti da acciaio inossidabile, i n. 4 e 5 erano una lega di Ti/C e il n. 6 era costruito in puro C. Sei piercing (n. 1-6) sono stati comprati da negozi ufficiali, mentre quattro (n. 7-10) sono stati acquistati sulle bancarelle ed erano di composizione ignota.

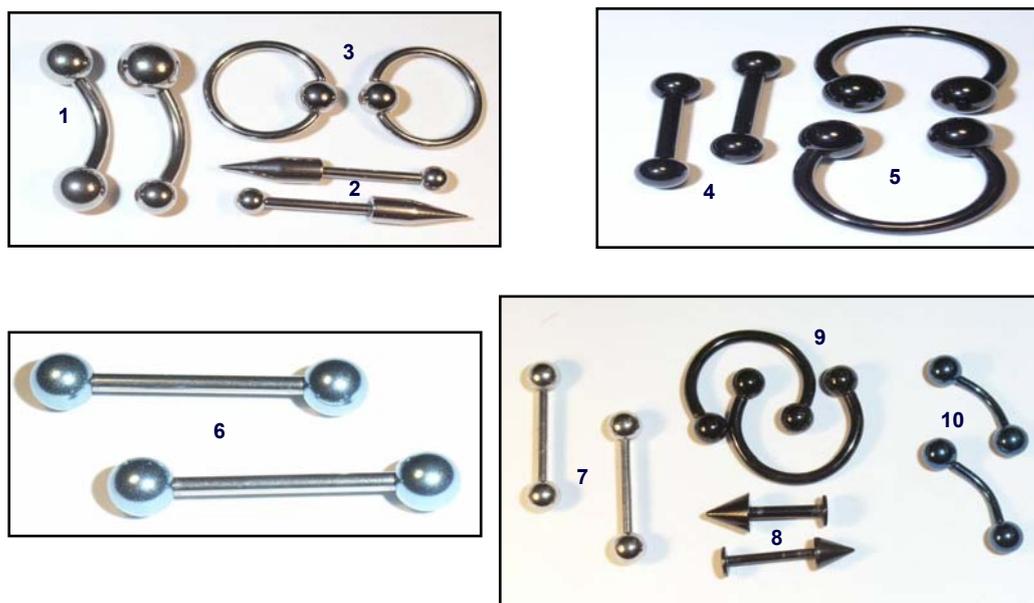


Figura 2. Piercing di varie fogge e colori campionati sul mercato

## Metodo

I piercing sono stati sottoposti a prove per verificare il rilascio dei metalli nella SSS, come descritto dalla norma UNI EN 1811:2000 (20). Le concentrazioni di Co, Cr e Ni presenti nelle soluzioni così ottenute sono state quantificate tramite SF-ICP-MS (18).

## Risultati

Nella Figura 3 sono riportati i risultati dell'analisi di Co, Cr e Ni nella SSS dopo una settimana di estrazione dai piercing. Anche in questo caso i dati del Ni sono comparati con il limite di  $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$  riportato dalla Direttiva della Commissione 2004/96/CE (11) e indicato dalla linea orizzontale. In assenza di una normativa specifica, anche i dati per Co e Cr sono stati paragonati a tale limite.

I risultati hanno evidenziato differenze sostanziali tra gli oggetti acquistati nei negozi ufficiali e quelli comprati sulle bancarelle. In linea generale, gli oggetti provenienti dalle bancarelle (n. 7-10) hanno mostrato un rivestimento facilmente attaccabile dopo immersione nella SSS (bassa resistenza alla corrosione) e tassi di rilascio di Co, Cr e Ni significativamente più alti di quelli mostrati dagli oggetti comprati in negozi ufficiali (n. 1-6). In particolare, nei 6 piercing comprati dai rivenditori ufficiali la quantità di Ni nella SSS è notevolmente al disotto del limite di  $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$ , con un massimo di  $0,024 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$  nell'oggetto n. 4.

Negli stessi oggetti, il rilascio di Co e Cr è risultato trascurabile (quantità massime cedute: Co,  $0,00063 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$  dal piercing n. 2; Cr,  $0,0053 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{settimana}$  dal piercing n. 1). Vale la pena, quindi, sottolineare che dai piercing costruiti in acciaio inossidabile, in lega di Ti/C e in C puro acquistati nei negozi ufficiali, non sono state riscontrate migrazioni rilevanti dei tre allergeni nella SSS. Al contrario, sono stati osservati rilasci significativi di tutti i metalli dagli oggetti acquistati sulle bancarelle (n. 7-10).

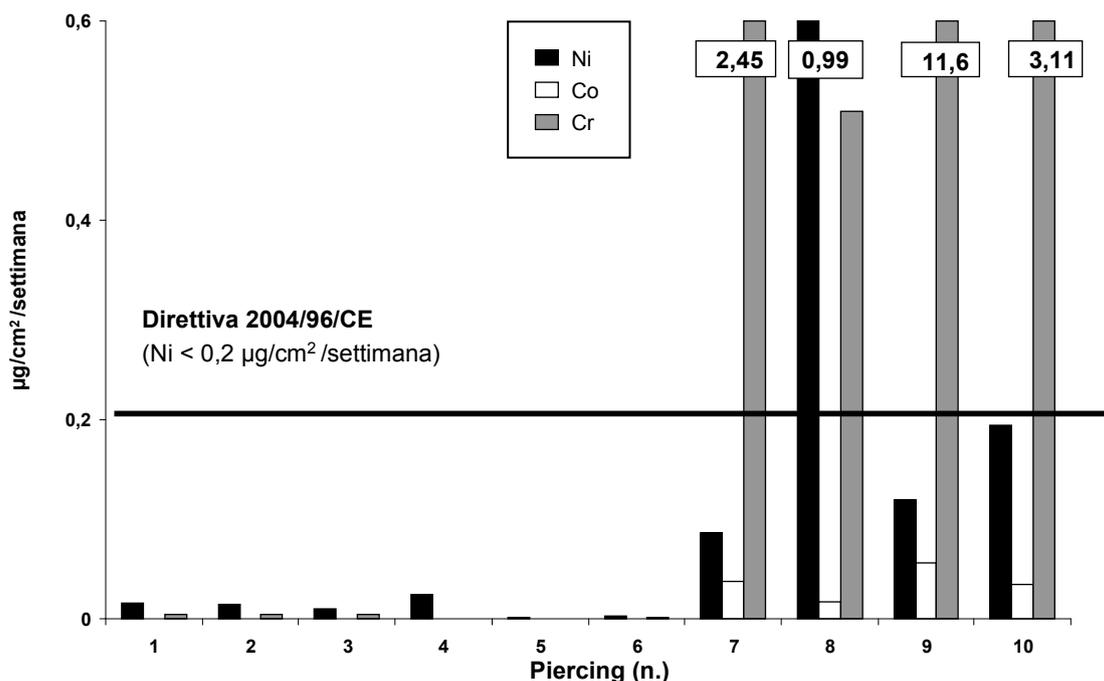


Figura 3. Valori di Co, Cr e Ni rilasciati dai 10 piercing

È da notare che, tra i 3 metalli allergeni, il Cr è il metallo più ceduto, con tassi di rilascio molto variabili a seconda dell'oggetto e molto più alti (valore massimo: 11,6 µg/cm<sup>2</sup>/settimana dal piercing n. 9) del limite imposto dalla normativa per il Ni. Solo un piercing (n. 8) ha rilasciato Ni a concentrazione (0,99 µg/cm<sup>2</sup>/settimana) superiore (di circa 5 volte) a tale limite. Il Co, invece, seppur rilasciato in quantità misurabili da tutti i piercing, è risultato sempre al di sotto del limite (quantità massima ceduta: 0,056 µg/cm<sup>2</sup>/settimana dal piercing n. 9).

Da tali risultati si è potuto evincere che il rischio di sensibilizzazione da metallo può essere più elevato quando si indossano oggetti comprati sulle bancarelle; per tali oggetti gli alti tassi di rilascio sembrano essere legati alla scarsa qualità del materiale utilizzato nella loro costruzione. Inoltre, sembra che il rischio di sensibilizzazione dovuto al Cr possa essere più elevato rispetto a quello dovuto al Ni, con alcuni casi particolari in cui l'azione sinergica tra Cr e Ni potrebbe rappresentare un fattore determinante.

## Colori per tatuaggi

### Campioni

La maggior parte dei tatuaggi sono inchiostri a base di sali metallici il cui uso primario non è proprio quello di essere inseriti sotto la pelle. In particolare, i pigmenti bianchi derivano dal biossido di Ti, naturalmente presente nell'ambiente come anatasio o rutilo. Tra le sostanze utilizzate per la produzione del blu sono da includere il carbonato di Cu (azzurrite), il silicato di Na e Al (lapislazzuli), il silicato di Cu e Ca (blu egiziano), la ftalocianina di Cu, l'alluminato di Co (blu di cobalto) e gli ossidi di Cr. L'inchiostro nero naturale è ottenuto dalla magnetite e

dalla wustite (ossidi di Fe) o dalla combustione di C amorfo. Il colore nero può anche essere inchiostro India che contiene particelle di C o il cosiddetto logwood che viene estratto dalla pianta *Haematoxylum campechianum* (contenente Cr). Il pigmento giallo è realizzato col solfuro di Cd. Il colore grigio è di solito un prodotto a base di C. L'ocra che è composta da ossidi di Fe mescolati con argilla è il componente base del marrone. Il colore rosso è di solito dovuto al solfuro di Hg, ma possono anche essere usati il solfuro di Cd e il seleniuro di Cd, o in alternativa l'ossido di Fe (ruggine) e l'idrato ferrico (terra di siena/ocra rossa). L'ingrediente utilizzato per la produzione dei pigmenti verdi è principalmente l'ossido di Cr, ma vengono usati anche altri composti quali i sali di Cu (ftalocianina di Cu e malachite), il cromato di Pb (giallo cromo) e il ferrocianuro ferrico (blu di Prussia). Il sale metallico usato per il colore viola contiene Mn.

L'analisi chimica dei colori che poi vengono utilizzati per tatuare il corpo è di fondamentale importanza e serve a garantire qualità e sicurezza per il consumatore. La composizione chimica dei colori è ancora poco conosciuta e, in molti casi, è difficile recuperare le informazioni sugli ingredienti degli inchiostri perché sono relativamente pochi i fornitori che rilasciano insieme al prodotto la relativa documentazione.

In quest'ottica, un totale di 56 colori per tatuaggi sono stati acquistati da 4 fornitori italiani ufficiali (Tabella 2): 13 colori della Starbrite Colors, 10 colori della Millennium Colorworks Inc., 13 colori della Intenze Prod. e 20 colori della Diabolo Colors e caratterizzati per il loro contenuto in Co, Cr e Ni.

**Tabella 2. Lista dei fornitori e nomi commerciali dei 56 colori**

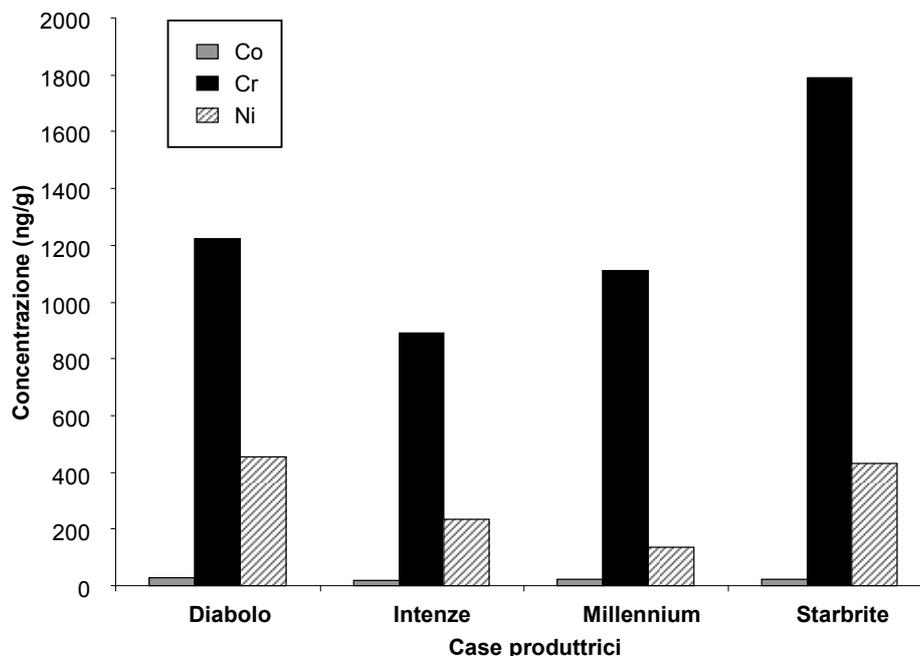
Colore	Diabolo	Intenze	Millennium	Starbrite
<b>Arancione</b>	Dark orange; Orange	Peach; Rose pink	Agent orange	Brite orange
<b>Bianco</b>	Intense white	Snow white opaque	Power white	Brite white
<b>Blu</b>	Blue; Turquoise; Ultramarine	Baby blue	Ice blue	Country blue; Deep blue; Deep turquoise
<b>Giallo</b>	Basic yellow; Dark yellow	Banana cream	Hello yellow	Canary yellow; Golden yellow
<b>Grigio</b>	Grey; Sumi grey	Platinum	Hound grey	-
<b>Marrone</b>	Noisette	Dark chocolate	Doo Doo brown	Deep maroon
<b>Nero</b>	Magic black	True black	Black Honyx	Black outlining ink
<b>Rosso</b>	Basic red; Bordò; Chinese red; Port red	Cherry bomb; True magenta	Monthly red	Scarlet red
<b>Verde</b>	Basic green; Willow green	Grasshopper	Mean green	Deep green; Lime green
<b>Viola</b>	Light violet; Violet	Grape; Lavender	Violent violet	Deep violet

## Metodo

Circa 0,25 g di colore per tatuaggi è stato digerito in forno a microonde con una miscela acida (HNO<sub>3</sub>-HF-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le soluzioni successivamente diluite con acqua deionizzata sono state analizzate per il contenuto di Co, Cr e Ni con la tecnica SF-ICP-MS (19).

## Risultati

In generale, gli inchiostri hanno mostrato una composizione in metalli molto variabile sia da produttore a produttore che da colore a colore. Gli intervalli (minimo-massimo) di concentrazione indicano che il metallo più abbondante nei colori è il Cr (315-147.229 ng/g), seguito dal Ni (37,5-9592 ng/g) e poi dal Co (2,78-6439 ng/g). In Figura 4 sono riportate le concentrazioni mediane di Co, Cr e Ni presenti nei 56 colori divisi per casa produttrice.



**Figura 4. Concentrazione (mediana, in ng/g) di Co, Cr e Ni nei colori di 4 diverse case produttrici**

Nonostante la variabilità delle concentrazioni ottenute, dalla Figura 4 si evince che tutte le quattro case produttrici hanno fornito colori contenenti concentrazioni elevate di Cr (1000-1800 ng/g) e di Ni (100-500 ng/g) mentre il Co è presente a valori più bassi (decine di ng/g). I colori prodotti dalla Starbrite e la Diabolo hanno mostrato i contenuti più alti di Cr e Ni.

In Figura 5 sono riportate le concentrazioni mediane dei metalli in funzione del colore campionato.

La quantità maggiore di Cr è stata riscontrata nel colore verde, ma anche nel viola, marrone, blu, nero e rosso le quantità mediane sono risultate superiori a 1000 ng/g. Il Ni è risultato prevalente nel verde e nel blu ad una concentrazione di circa 800 ng/g; nei colori bianco, grigio, marrone, rosso e viola la concentrazione di Ni era circa la metà. Il Co non mostrava differenze significative tra i diversi colori analizzati, seppur la più alta concentrazione è stata rilevata nel colore viola (circa 36 ng/g).

I valori ottenuti sono stati confrontati con i limiti indicati dalla Risoluzione ResAP(2008)1 del Consiglio d'Europa (15), che adotta i seguenti livelli consentiti dei metalli, intesi come impurezze, nei colori per tatuaggi: Co, 25.000 ng/g; Cr(VI), 200 ng/g; Ni, il più basso possibile. Rispetto a tali limiti, il Co era contenuto fino ad un massimo di 6439 ng/g; il Cr totale (comprendente anche il CrVI) ha mostrato un massimo di 147.229 ng/g; il Ni era contenuto fino a 9592 ng/g.

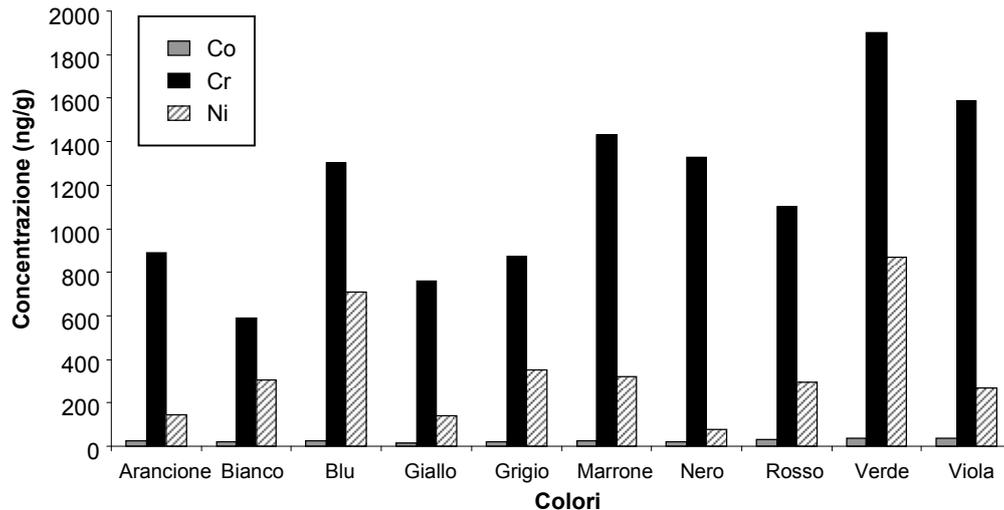


Figura 5. Livelli mediiani di concentrazione in ng/g di Co, Cr e Ni nei dieci colori

Questi dati hanno indicato che tutti i campioni contenevano Co ben al di sotto del limite richiesto; per il Cr un confronto diretto non è stato possibile in quanto i nostri dati si riferiscono al Cr totale e non al Cr(VI); il Ni era presente in tutti i colori a concentrazioni significative. Questo vuol dire che il Co potrebbe ancora essere considerato un'impurezza all'interno dei campioni; mentre, il Cr e il Ni sembrano essere ingredienti del colore.

In aggiunta, le concentrazioni di Co, Cr e Ni determinate nei pigmenti sono state paragonate con i livelli individuati come "allergologicamente sicuri" per i consumatori esposti a prodotti contenenti tali metalli. In questo contesto, Basketter *et al.*, (2003) hanno dimostrato che raramente si riscontrano reazioni allergiche e/o sensibilizzanti ai 3 metalli a livelli inferiori ai 10 µg/g. Per questo motivo gli stessi Autori raccomandano che i prodotti di consumo debbano contenere meno di 5 µg/g di Co, Cr e Ni o, per una maggiore sicurezza, meno di 1 µg/g (21). I nostri risultati hanno mostrato che il 62,5% dei colori conteneva livelli di Cr al di sopra del limite di 1 µg/g; il 69,2% di questi inchiostri appartenevano alla Starbrite, l'80,0% alla Millennium, il 46,1% alla Intenze e il 60,0% alla Diabolo. Per quanto riguarda il Ni, il 16,1% dei campioni superavano il limite di tolleranza raccomandato, e di questi il 15,3% appartenevano alla Starbrite, il 10,0% alla Millennium, il 7,7% alla Intenze e il 25,0% alla Diabolo. Nel caso del Co, un solo campione (ovvero l'1,8% di tutti i casi) superava il limite di sicurezza allergologica. Da ciò si evince che i colori campionati sembrano non sicuri da un punto di vista dermatologico per gli alti contenuti di Cr e Ni, mentre la concentrazione di Co non sembra rappresentare un rischio.

## Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che:

- nelle tre categorie di prodotti (bigiotteria, piercing e colori per tatuaggi) il Ni e il Cr sono contenuti a livelli al di sopra dei limiti consentiti indicando un possibile rischio dermatologico;

- i tassi più alti di cessione riscontrati negli oggetti comprati sulla bancarella denotano come la qualità del materiale risulti un parametro da non sottovalutare per l'uso sicuro di tali oggetti dal prezzo competitivo;
- la grossa variabilità nel contenuto dei metalli negli oggetti campionati indica che il mercato è piuttosto eterogeneo dal punto di vista della tecnologia di produzione;
- la contemporanea presenza di più di un metallo allergene non esclude il rischio di sensibilizzazione crociata a causa degli effetti sinergici tra i metalli.

Questa indagine del mercato italiano può rappresentare un primo passo per garantire la sicurezza delle persone che utilizzano bigiotteria e piercing e che decidono di tatuarsi. A tal fine si ribadisce l'importanza di:

- implementare la ricerca sulla caratterizzazione chimica di tali oggetti e prodotti di largo consumo, prendendo in considerazione anche altre categorie di prodotto e altre sostanze chimiche;
- informare e tutelare maggiormente i consumatori attraverso un'etichettatura dei prodotti più adeguata (composizione e avvertenze);
- implementare la legislazione presente e regolamentare le materie prime soprattutto per quei prodotti che permangono sotto pelle per anni (tatuaggi e piercing);
- implementare i controlli sul mercato sia a livello di produzione che di vendita per il rispetto delle norme vigenti.

## Bibliografia

1. The ESSCA Writing Group. The European Surveillance System of Contact Allergies (ESSCA): results of patch testing the standard series, 2004. *JEADV* 2008;22:174-81.
2. Krob HA, Fleischer Jr AB, D'Agostino Jr R, Haverstock CL, Feldman S. Prevalence and relevance of contact dermatitis allergens: a meta-analysis of 15 years of published T.R.U.E. test data. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:349-53.
3. Nguyen SH, Dang TP, Macpherson C, Maibach H, Maibach HI. Prevalence of patch test results from 1970 to 2002 in a multi-centre population in North America (NACDG). *Contact Dermatitis* 2008;58:101-6.
4. Rui F, Bovenzi M, Prodi A, Belloni Fortina A, Romano I, Peserico A, Corradin MT, Carrabba E, Larese Filon F. Nickel, cobalt and chromate sensitisation and occupation. *Contact Dermatitis* 2010;62:225-231.
5. Wöhrl S, Hemmer W, Focke M, Götz M, Jarisch R. Patch testing in Children, Adults, and the Elderly: Influence of Age and Sex on Sensitization Patterns. *Pediat Dermatol* 2003;20:119-23.
6. Lidèn C, Bruze M, Menné T. Metals. In: Frosch PJ, Menné T, Lepoittevin J-P (Ed.). *Contact Dermatitis*. Heidelberg: Springer; 2006. p. 537-568.
7. Shelnutt SR, Goad P, Belsito DV. Dermatological toxicity of hexavalent chromium. *Crit Rev Toxicol* 2007;37:375-87.
8. Fyhrquist-Vanni N, Alenius H, Lauerma A. Contact dermatitis. *Dermatol Clin* 2007;25:613-23.
9. Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation-biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 2006;355:973-5.
10. Rycroft RJG, Menné T, Frosch PJ, Lepoittevin J-P (Ed.). *Textbook of contact dermatitis*. Berlino: Springer-Verlag; 2001.
11. Direttiva 94/27/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 giugno 1994 che stabilisce la dodicesima modifica della direttiva 76/769/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati Membri relative alla limitazione

- dell'immissione sul mercato e dell'uso di talune sostanze e preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* serie L 188 del 27/7/1994, p. 1-2.
12. Direttiva 2004/96/CE della Commissione, del 27 settembre 2004, recante modifica della direttiva 76/769/CEE del Consiglio per quanto riguarda le restrizioni in tema di commercializzazione e uso di nickel in oggetti metallici utilizzati nelle parti perforate ai fini dell'adeguamento dell'allegato I al progresso tecnico. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* serie L 301 del 28/8/2004, p. 51-52.
  13. Direttiva 76/768/CEE del Consiglio, del 27 luglio 1976, concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative ai prodotti cosmetici. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* serie L 262 del 27/9/1976, p. 169-200.
  14. Direttiva 2004/93/CE della Commissione, del 21 settembre 2004, che modifica la direttiva 76/768/CEE per adeguare al progresso tecnico i suoi allegati II e III. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* serie L 300 del 25/9/2004, p. 13-41.
  15. Council of Europe. *Resolution ResAP(2008)1/E on requirements and criteria for the safety of tattoos and permanent make-up (superseding resolution ResAP(2003)2 on tattoos and permanent make-up)*. Strasbourg, France: Council of Europe; 2008.
  16. Basketter DA. Skin sensitization: strategies for the assessment and management of risk. *Br J Dermatol* 2008;159:267-73.
  17. Bocca B, Forte G, Senofonte O, Violante N, Paoletti L, De Berardis B, Petrucci F, Cristaudo A. A pilot study on the content and the release of Ni and other allergenic metals from cheap earrings available on the Italian market. *Sci Total Environ* 2007;388:24-34.
  18. Bocca B, Caimi S, Senofonte O, Petrucci F, Feliciani R, Milana MR, De Berardis B, Paletti L, Forte G. The X-Ray and SF-ICP-MS analysis of content and release of allergenic metals from body piercing. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal* 2009;2:35-41.
  19. Forte G, Petrucci F, Cristaudo A, Bocca B. Market survey on toxic metals contained in tattoo inks. *Sci Total Environ* 2009;407:5997-6002.

# FIORITURE DI CIANOBATTERI TOSSICI IN ACQUE DOLCI: UN APPROCCIO INTEGRATO PER LA VALUTAZIONE E LA GESTIONE DEL RISCHIO

Simona Scardala (a), Mara Stefanelli (a), Susanna Vichi (b)

(a) *Reparto Qualità degli ambienti acquatici e acque di balneazione, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Reparto Meccanismi di tossicità, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

I cianobatteri sono batteri Gram negativi e fotosintetici la cui origine risale a circa 2,5 miliardi di anni fa. Hanno caratteristiche morfologiche diverse con forme unicellulari, coloniali e filamentose.

Distribuiti in tutto il pianeta, sono capaci di vivere in habitat molto diversi, anche se prediligono gli ambienti acquatici, in particolare i laghi naturali e gli invasi artificiali, dove sono naturalmente presenti.

La crescente eutrofizzazione, dovuta all'aumento delle immissioni di nutrienti di origine antropica ha favorito la loro crescita anche a livelli elevati, con conseguente formazione di fioriture.

Il problema sanitario legato alla presenza dei cianobatteri è dovuto alla loro capacità di produrre sostanze tossiche, dette cianotossine, alle quali l'uomo può essere esposto attraverso diverse vie (Funari & Testai, 2008). La principale via di esposizione umana è la via orale mediante ingestione di alimenti, supplementi alimentari, acque potabili e accidentalmente acque ad uso ricreativo, che risultano contaminate. L'esposizione a cianotossine può avvenire anche per via cutanea e inalatoria, durante attività ricreative e professionali in acque contaminate e, non meno importante, per via parenterale nel caso in cui venga usata acqua contaminata per emodialisi.

La stessa specie di cianobatteri può essere associata a fioriture tossiche e non tossiche (Kurmayer *et al.*, 2002) e può produrre una o più tossine che possono essere classificate in diverse categorie in base agli effetti osservati sugli organi o tessuti bersaglio (Codd *et al.*, 2005). Queste includono:

- epatotossine (oltre 80 varianti di microcistine, 6 varianti note di nodularine)
- neurotossine (anatotossina-a, omoanatotossina-a, anatotossina-a(s), 20 varianti note di saxitossine)
- citotossine (cilindropermopsina)
- tossine irritanti e gastrointestinali
- altre tossine con profilo tossicologico parziale (microviridina J e la  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina) (Rohrlach *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2005)

La presenza di fioriture di cianobatteri è stata documentata in tutto il mondo e anche in Italia le segnalazioni sono numerose. Alcune tra le specie di cianobatteri tossici di cui si hanno segnalazioni nel nostro Paese sono *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix rubescens*, *Planktothrix agardhii*, *Cylindropermopsis raciborskii*, *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena lemmermannii*, *Anabaena planctonica*, *Aphanizomenon ovalisporum* e *Aphanizomenon flos-aquae* (Figura 1).

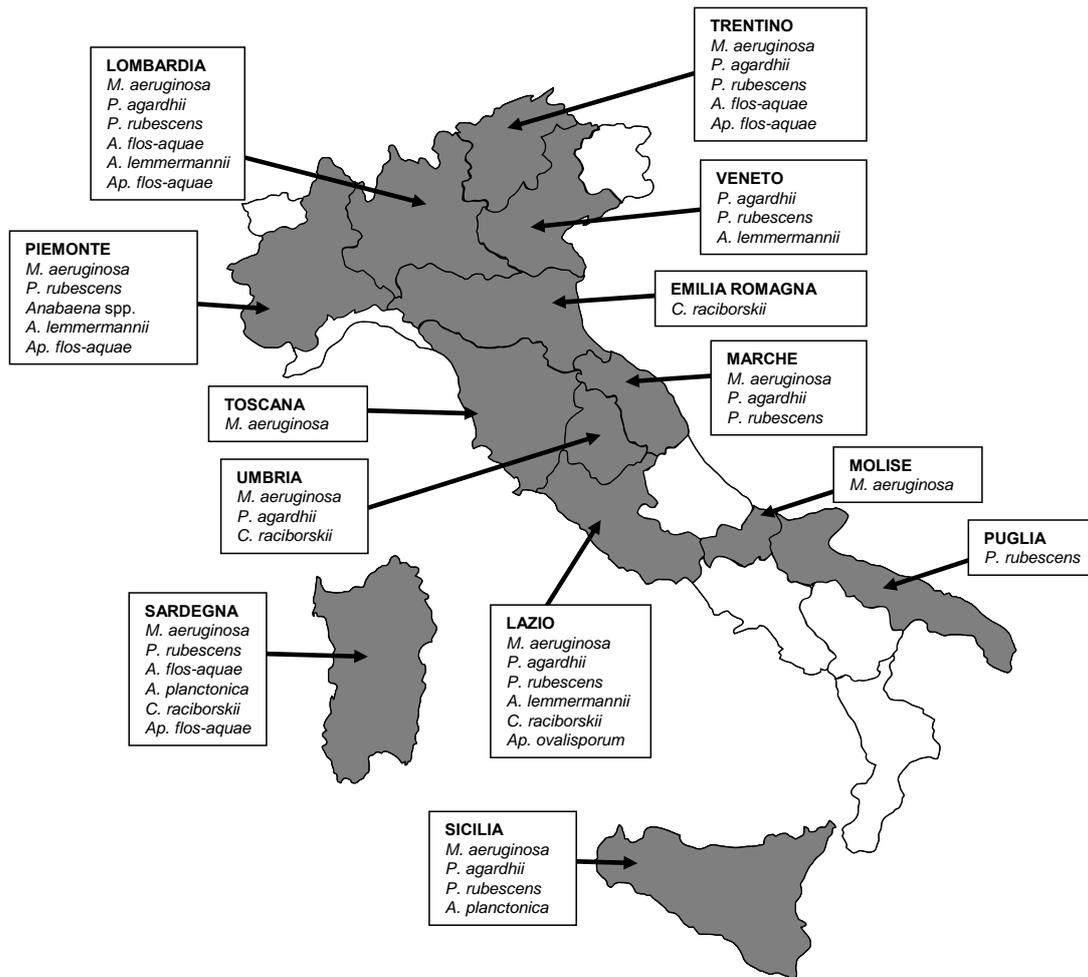


Figura 1. Distribuzione dei cianobatteri nelle varie Regioni italiane

La potenziale tossicità dei cianobatteri e il possibile impatto sanitario hanno portato ad un netto aumento dei piani di monitoraggio, la maggior parte dei quali prevede la sola determinazione della densità cellulare attraverso la conta dei cianobatteri mediante osservazione delle cellule al microscopio. È però da tenere in considerazione che in una specie non tutti gli individui sono tossici (la produzione della tossina dipende dallo specifico make-up genetico) e che il rapporto tra individui tossici e non tossici varia nel tempo con dinamiche ancora non chiarite. La sola densità cellulare non fornisce quindi informazioni sufficienti su quella che è la reale quantità di cianotossine.

## Obiettivo

L'obiettivo degli studi effettuati è stato quindi quello di capire le relazioni che intercorrono tra le condizioni ambientali, le fioriture e la tossicità dei cianobatteri al fine di poter identificare dei parametri cruciali da utilizzare per la pianificazione di piani di monitoraggio e per la

valutazione del rischio. Per fare ciò si è deciso di applicare un approccio integrato che prendesse in considerazione le caratteristiche chimico-fisiche del corpo idrico in esame, la dinamica spaziale e temporale della popolazione cianobatterica, il ruolo della comunità batterica nel riciclo dei nutrienti come possibile fattore di sostegno per la fioritura, i livelli di cianotossine e l'identificazione dei geni responsabili della produzione di tossina e la loro quantificazione.

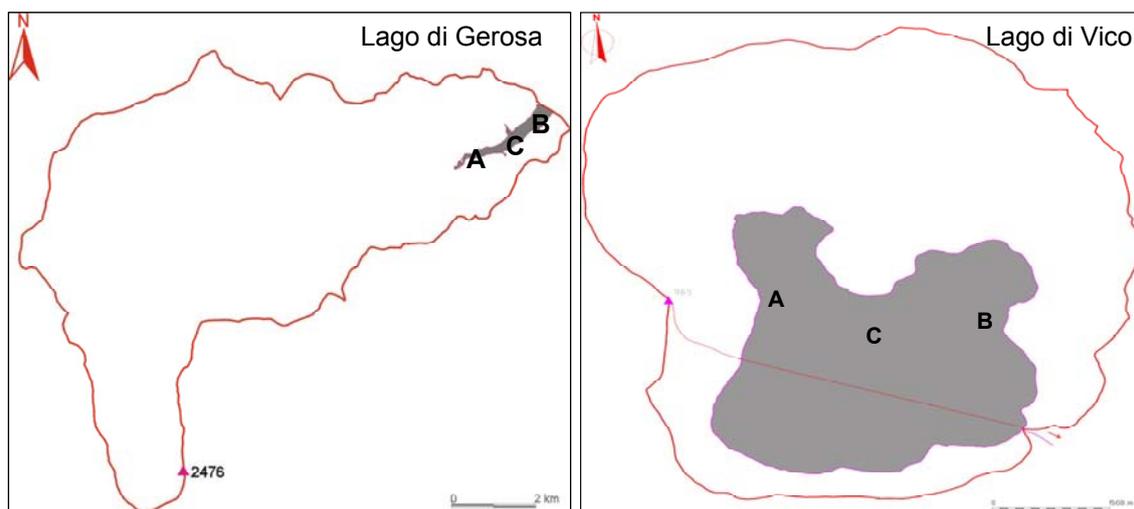
Questo tipo di approccio è stato applicato a due laghi del Centro Italia: il Lago di Gerosa, un piccolo bacino artificiale usato per attività ricreative, come riserva di acqua per irrigazione e potenzialmente come approvvigionamento di acqua potabile (Manganelli *et al.*, 2010); e il Lago di Vico, un piccolo lago vulcanico, usato per attività ricreative e come riserva di acqua potabile. I due laghi, anche se presentano caratteristiche ecologiche molto diverse, sono interessati da fenomeni di fioriture di *Planktothrix rubescens*, cianobatterio tossico caratteristico di climi temperati. *P. rubescens* è una specie comune in corpi d'acqua profondi, stratificati, oligotrofici o mesotrofici. Ben adattata a crescere in condizioni di basse radiazioni luminose, durante l'estate è in grado di stratificare nel metalimnio dove maggiore è la disponibilità di nutrienti. Le sue fioriture sono ben visibili di colore rosso porpora e si verificano prevalentemente in autunno-inverno. *P. rubescens* può produrre microcistine (Sivonen & Jones, 1999), note epatotossine.

## Materiali e metodi

Per il raggiungimento del nostro obiettivo è stato predisposto un piano di campionamento rappresentativo dei due laghi (Figura 2) (CNR-IRSA-ISE, 2004) (Tabella 1).

I campionamenti sono stati effettuati mensilmente: da ottobre 2006 a giugno 2007 per il Lago di Gerosa e da febbraio 2009 a dicembre 2010 per il Lago di Vico, per il quale durante il periodo di fioritura (da novembre 2009 ad aprile 2010) sono stati eseguiti prelievi settimanali.

10 L di campione per ogni sito sono stati prelevati attraverso l'uso di campionatori Niskin, conservati al buio in contenitori di polycarbonato, precedentemente lavati in acido, e mantenuti alla temperatura di campionamento fino all'analisi.



**Figura 2. Lago di Gerosa e Lago di Vico:  
A, B, C sono i punti di campionamento**

Tabella 1. Stazioni di prelievo e piano di campionamento per i due laghi

Località	Stazione	Punto di prelievo	Profondità di prelievo (m)
Lago di Gerosa	A	Immissario	0,5
	B	Emissario	0,5
	C	Centro lago	0,5
			25
			50
Lago di Vico	A	Lido Fogliano	0,5
	B	Bella Venere	0,5
	C	Centro lago	1
			20
			40

## Parametri fisico-chimici e analisi dei nutrienti

Per le analisi dei nutrienti (P e N totale, P-PO<sub>4</sub>, N-NO<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NH<sub>4</sub>), sono stati utilizzati i metodi standard (APAT & IRSA-CNR, 2003) mentre per la determinazione della clorofilla-a è stato utilizzato il metodo di estrazione con etanolo e successiva determinazione in fluorescenza (Jespersen & Christoffersen, 1987). I campioni d'acqua sono stati filtrati su filtri GF/F (porosità nominale 0,7 µm) (Whatman). I filtri sono stati posti in provette di vetro per fluorimetro e lasciati al buio per 24 ore in 6 mL di etanolo al 96%; le letture sono state effettuate con un fluorimetro TURNER 10-AU-005, alla lunghezza d'onda di 450/570 (ex/em).

## Densità di cianobatteri

La conta di *Planktothrix rubescens* è stata effettuata mediante microscopio ad epifluorescenza. Cinque-dieci mL di campione fissati in formaldeide (concentrazione finale 4%) sono stati filtrati su filtri neri in policarbonato da 5 µm (25 mm diametro) (Whatman). I filamenti sono stati contati in autofluorescenza (450-490 nm) (Olympus BX51). Il numero delle cellule per filamento è stato determinato come media del numero di cellule contate su almeno 50 filamenti.

L'analisi della restante comunità di cianobatteri è stata effettuata mediante l'utilizzo di pozzetti di sedimentazione (metodo Utermhöl) dopo fissazione del campione in formaldeide (concentrazione finale 4%). In presenza di comunità cianobatteriche complesse, come nel caso del Lago di Vico, gli individui appartenenti a specie considerate potenzialmente tossiche (*Limnothrix redekei*, *Synechococcus* sp.) sono stati isolati e mantenuti in laboratorio in condizioni idonee alla crescita.

## Densità delle cellule batteriche e misure di attività ectoenzimatiche

I batteri sono stati contati in epifluorescenza, dopo fissazione con formaldeide (concentrazione finale 4%) e colorazione con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo, concentrazione finale 1 µg/mL). Cinque mL di campione fissati e colorati sono stati filtrati su filtro da 0,22 µm nero in

policarbonato (diametro 25 mm) (Whatmann). Sono stati contati un minimo di 30 campi, per un numero minimo di 300 cellule, ad un ingrandimento di 1000x, con microscopio ad epifluorescenza (Olympus BX51). Per la misura delle attività ectoenzimatiche (leucina-aminopeptidasi, lipasi e fosfatasi alcalina) sono stati utilizzati substrati legati covalentemente ad un fluorocromo (7-amino-4-metilcumarine o AMC, e metil-umbelliferone o MUF) che diventa fluorescente dopo scissione enzimatica del complesso molecolare: la cinetica dell'incremento della fluorescenza è una misura indiretta dall'attività enzimatica (Hoppe, 1983). I risultati sono espressi in AMC o MUF L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> dopo lettura di una curva di calibrazione con MUF e AMC. I saggi sono stati effettuati in piastre sterili da 96 e 24 pozzetti (Costar, USA), con un fluorimetro modello Wallac Victor<sub>2</sub>, PerkinElmer, alla lunghezza d'onda di 355/460 (ex/em).

## Analisi delle cianotossine

Sui campioni pervenuti in laboratorio è stata determinata sia la concentrazione di microcistine disciolte (extracellulare) (MC-Dis) che quella totale (extracellulare+intracellulare) (MC-Tot). All'arrivo in laboratorio i campioni sono stati separati in due aliquote, la prima, utilizzata per la determinazione delle MC-Dis, è stata immediatamente filtrata mentre la seconda, utilizzata per la determinazione delle MC-Tot è stata sottoposta a due cicli di congelamento/scongelo per causare la lisi cellulare e il conseguente rilascio in acqua delle cianotossine. I campioni così trattati sono stati quindi processati tramite Solid Phase Extraction (SPE) con piccole modifiche rispetto al metodo proposto da Lawton *et al.*, (1994) e successivamente analizzati mediante cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa tandem (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) utilizzato nella modalità di acquisizione *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Lo strumento è stato settato per la ricerca dei seguenti congeneri per i quali ad oggi è disponibile in commercio lo standard: MC-LR, -dem-LR, -RR, dem-RR, -LF, -LW, -LA, -YR.

Per il metodo applicato è stato calcolato un limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) compreso tra 2 ng/L (MC-RR) e 9 ng/L (MC-LW).

Sui campioni del Lago di Gerosa è stata effettuata anche l'analisi mediante metodi immunoenzimatici per testarne l'efficacia come metodo di screening rispetto all'analisi in LC-MS/MS. Per tali analisi i campioni, dopo la lisi cellulare, sono stati filtrati su filtri Sterivex da 0,2 µm. Il filtrato è stato analizzato con kit ENVIROLOGIX, che riporta un LOD di 0,147 ppb, seguendo le istruzioni del produttore.

## Ricerca e quantificazione dei genotipi tossici

Per l'analisi molecolare, un volume di campione pari a 250-500 mL è stato filtrato su membrane Supor 0,2 µm e congelato a -20°C. Le cellule raccolte e risospese in tampone PBS sono state centrifugate in modo da ottenere un pellet, sottoposto a estrazione del DNA. La concentrazione e la purezza (determinata come rapporto A260/A280) del materiale genomico estratto sono state verificate mediante biofotometro.

L'identificazione dei cianobatteri appartenenti a *Planktothrix* è stata ottenuta mediante la ricerca di specifiche sequenze marker diagnostiche, in particolare lo spaziatore intergenico dell'operone Ficocianina (PC-IGS) e la regione rDNA16S. La presenza di individui tossici è stata testata mediante l'amplificazione all'interno dell'operone *mcy* (geni *mcyB* e *mcyE*), coinvolto nella produzione delle microcistine attraverso un meccanismo di sintesi peptidica non-

ribosomale ottenuta per mezzo di grandi complessi a struttura modulare, le peptide sintetasi non ribosomiali (NRPSs). La conferma del genere di appartenenza delle cellule, sfruttando la regione PC-IGS e la potenziale capacità di produrre microcistine ricercando la presenza del marcatore di tossicità *mcyB*, è stata preliminarmente testata con analisi qualitativa mediante PCR e visualizzazione del prodotto di amplificazione su gel di agarosio 2%, secondo il metodo descritto da Kurmayer *et al.* (2004).

Nel caso del Lago di Vico, caratterizzato da una comunità cianobatterica eterogenea, l'analisi molecolare è stata utilizzata anche per confermare la specie di appartenenza di alcune forme unicellulari ritrovate nei campioni prelevati insieme a *P. rubescens*. Il metodo impiegato (Mühling *et al.*, 2005) permette di rilevare in un primo step la presenza di cianobatteri appartenenti a *Synechococcus*, *Prochlorococcus* e altre forme eterotrofe, sfruttando l'amplificazione di una regione all'interno del gene *rpoC1*. Il prodotto ottenuto sottoposto a una seconda PCR utilizzando dei primers interni discriminanti specifici è in grado di rilevare la presenza di cellule appartenenti a *Synechococcus*. Sono tuttora in corso studi volti all'identificazione molecolare di cellule appartenenti a *L. redekeii* potenzialmente in grado di produrre microcistine.

La quantificazione degli individui tossici (*mcyB* positivi) rispetto alla popolazione totale di *Planktothrix* (PC-IGS o 16S rDNA positivi) è stata realizzata mediante Taq Nuclease Assay (TNA). Le condizioni sperimentali, i primers e i probes utilizzati sono descritti da Kurmayer *et al.* (2004) e Ostermaier e Kurmayer (2009). Il saggio prevede, per ciascun target, l'utilizzo di una coppia di primers e una sonda TaqMan che è marcata con un fluorocromo reporter (FAM) all'estremo 5' e un quencher (TAMRA) al 3'. La quantificazione è stata effettuata sulla base di curve standard preliminarmente costruite, utilizzando diluizioni seriali di DNA a concentrazione nota (espressa come equivalenti di cellule) estratto da colture di *P. rubescens* CCAP 1460/3 e CCAP 1460/10. Le efficienze di qPCR per tutti i geni testati (PC-IGS, 16S rDNA e *mcyB*) erano comprese tra 95 e 99%. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

L'amplificazione del marcatore tassonomico (PC-IGS o 16S rDNA) e di tossicità (*mcyB*) è stata condotta simultaneamente in pozzetti separati. La composizione della comunità di *Planktothrix* in termini di cellule tossiche e non tossiche è stata misurata quantificando il numero di individui che riconoscono il marcatore di tossicità *mcyB* tra tutti quelli in grado di reagire con la regione PC-IGS/16S rDNA. La frazione di individui tossici all'interno della comunità *Planktothrix* è stata espressa come il rapporto *mcyB*/PC-IGS o *mcyB*/16S rDNA.

Le curve standard hanno mostrato per entrambi i marcatori scelti PC-IGS/16S rDNA e *mcyB* una relazione altamente significativa tra la concentrazione di DNA inizialmente presente (in termini di equivalenti di cellule) e i Ct. In ciascun caso, per entrambi i marcatori e per tutte le diluizioni, il numero di cellule stimato attraverso TNA su scala logaritmica correlava sempre con il numero di cellule inizialmente presenti contate al microscopio.

## Risultati e discussione

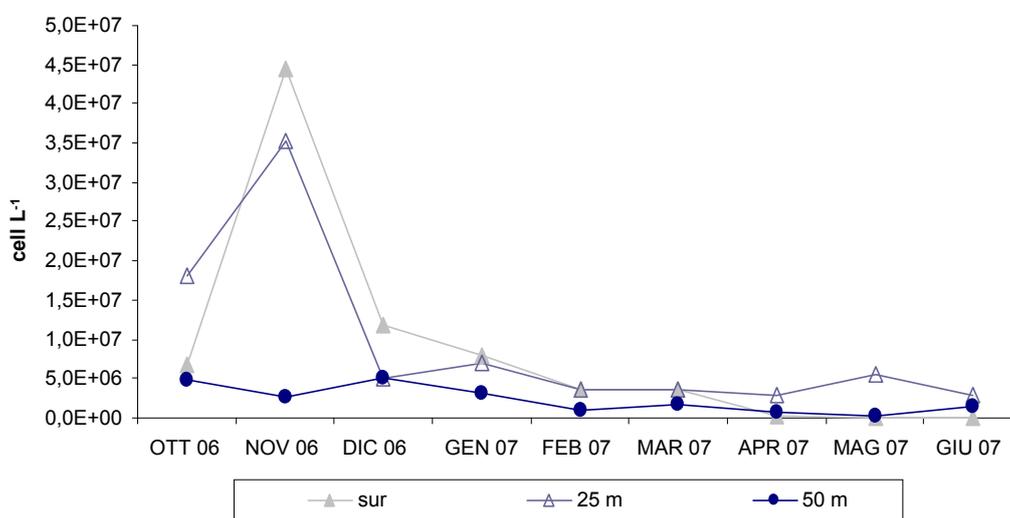
Dall'analisi dei dati risulta che sul Lago di Gerosa l'impatto antropico è modesto e infatti sia le concentrazioni dei nutrienti che quelle della clorofilla-a sono tipiche di un lago profondo oligotrofico (Quiros, 2003). Sul Lago di Vico, al contrario, l'impatto antropico è maggiore come dimostrato dai valori sia dei nutrienti che della clorofilla-a, tipici di un lago eutrofico (Legnani *et al.*, 2005; Jacquet *et al.*, 2005) (Tabella 2). Le concentrazioni più alte di nutrienti si riscontrano lungo la colonna alla profondità di -40 m, dove maggiore è l'effetto di rilascio dai sedimenti.

Tabella 2. Stato trofico dei due laghi (valori massimi e minimi per ogni lago) ( $\mu\text{g/L}$ )

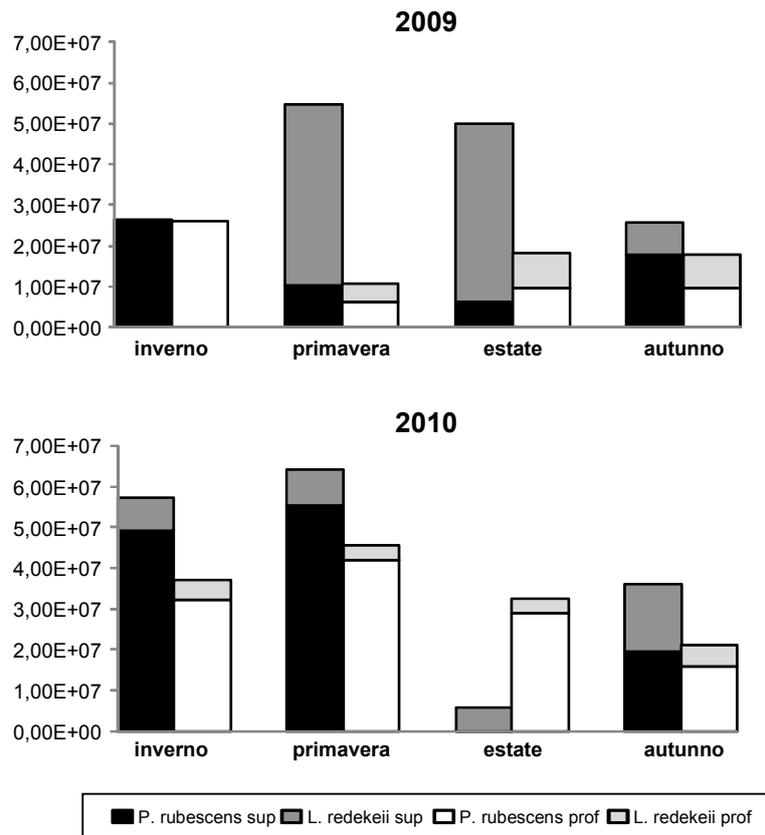
Indicatori dello stato trofico	Lago di Gerosa	Lago di Vico
Fosforo totale	2-24	2-400
Azoto inorganico	2-1404	33-2037
Clorofilla-a	0,3-6,20	1,16-26,73

Nel Lago di Gerosa *P. rubescens* è l'unico cianobatterio identificato sia morfologicamente che attraverso l'analisi molecolare qualitativa. Non è mai stato trovato nell'immissario mentre nell'emissario le sue densità sono sempre risultate molto più basse rispetto a quelle riscontrate lungo la colonna d'acqua.

La colonna d'acqua presenta un unico picco cellulare durante la fioritura invernale (novembre 2006), di  $4,4 \times 10^7$  cell/L. Dal mese di dicembre la fioritura inizia gradualmente a diminuire, fino a scomparire in estate dalla superficie, restando però costantemente presente in profondità a concentrazioni significative (Figura 3).

Figura 3. Abbondanza e dinamica di *P. rubescens* nel Lago di Gerosa

Nel Lago di Vico invece *P. rubescens* è molto dinamica e soggetta a variazioni sia stagionali che annuali accentuate, con un tendente aumento della sua abbondanza e un prolungarsi dei periodi di fioritura (Figura 4). È interessante notare come nei mesi estivi le densità cellulari nei campioni superficiali diminuiscano, talvolta fino a scomparire, andandosi a posizionare lungo la colonna d'acqua. *P. rubescens* risulta essere il cianobatterio dominante, ma la comunità di cianobatteri si presenta molto più complessa per la presenza sia di picocianobatteri (*Synechococcus* sp.) che di altre specie filamentose potenzialmente produttrici di microcistine (*Limnothrix redekeii*) (Gkelis *et al.*, 2001). Da tenere presente che le conte delle densità cellulari per la specie *L. redekeii* sono state effettuate a partire dalla primavera del 2009, e non si hanno dati pregressi né segnalazioni della sua presenza in studi precedenti. L'identificazione morfologica di alcune forme unicellulari descritte nel Lago di Vico è stata confermata anche con specifiche analisi molecolari.

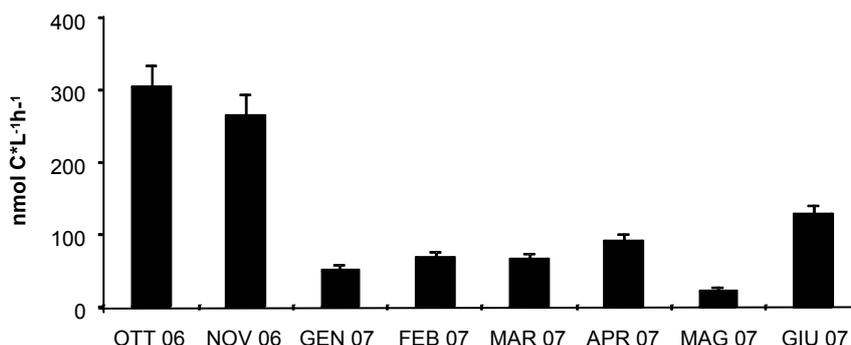


**Figura 4. Dinamica stagionale e annuale di *P. rubescens* e *L. redekeii* nel Lago di Vico (dati dei 3 siti superficiali e dei 2 siti di profondità sono stati mediati)**

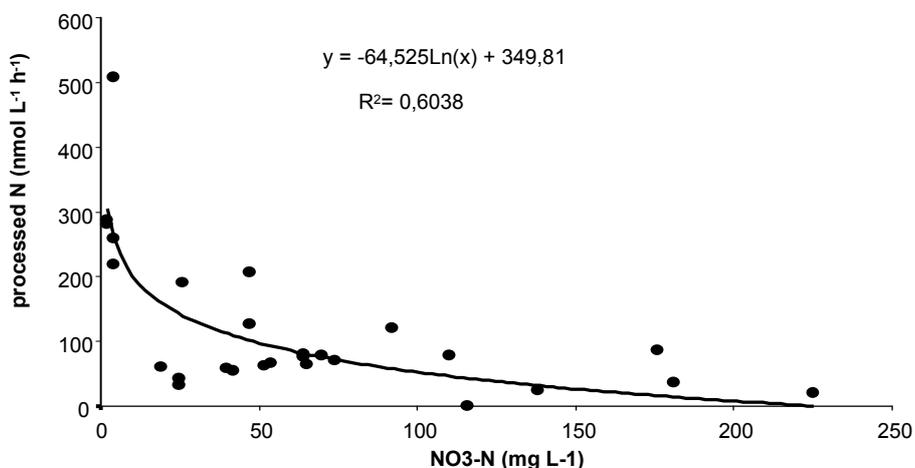
Con l'obiettivo di caratterizzare meglio la capacità di *P. rubescens* di dare fioriture in ambienti diversi, è stata studiata anche la comunità batterica presente nei due laghi. I batteri eterotrofi infatti sembrerebbero avere un ruolo nella produzione e nella modulazione delle cianotossine (Cood *et al.*, 2005), così come nella rigenerazione di substrati e nutrienti grazie alla presenza di enzimi superficiali, come la fosfatasi alcalina e l'aminopeptidasi, attraverso i quali degradano le molecole organiche e i polipeptidi di grandi dimensioni in molecole più piccole e più facilmente utilizzabili (Hollibaugh & Azam, 1983). Visto il persistere della fioritura di *P. rubescens* in un lago oligotrofico come quello di Gerosa, abbiamo ipotizzato che l'attività di riciclo dei nutrienti da parte dei batteri potesse avere un ruolo nel mantenimento della sua dinamica. Per verificare questa ipotesi si è deciso di analizzare le abbondanze batteriche e le relative attività ectoenzimatiche dei batteri, che forniscono indicazioni sul tasso di riciclo dei nutrienti, sulle interazioni fra gli organismi e la sostanza organica disciolta, sulle caratteristiche della sostanza organica disciolta stessa e sugli eventuali parametri che possono rappresentare fattori limitanti per la comunità.

Dalle analisi dei dati risulta che le abbondanze batteriche dei due laghi rispecchiano lo stato trofico che li caratterizza. Per il Lago di Gerosa l'abbondanza batterica rientra in valori, tra  $1,6 \times 10^8$  e  $33,4 \times 10^8$  cell/L (Manganelli *et al.*, 2010), tipici di un lago oligotrofico (Porter *et al.*, 2004), mentre per il Lago di Vico i valori, tra  $4,8 \times 10^8$  e  $90 \times 10^8$  cell/L, sono tipici di un lago eutrofico.

Nel lago di Gerosa il ruolo dei batteri nel riciclo dei nutrienti sembra essere di fondamentale importanza per il mantenimento della fioritura di *P. rubescens*: l'attività aminopeptidasica risulta essere la più rilevante, con alti valori soprattutto in coincidenza del picco di fioritura (Figura 5). Questa ipotesi è avvalorata da una correlazione negativa significativa tra aminopeptidasi e la concentrazione di nitrati (Figura 6) il che dimostrerebbe che là dove la concentrazione di azoto è bassa, l'intensa attività di rimineralizzazione da parte dei batteri è in grado di sopperire a questa carenza e di permettere a *P. rubescens* di usare questa fonte di azoto per crescere.

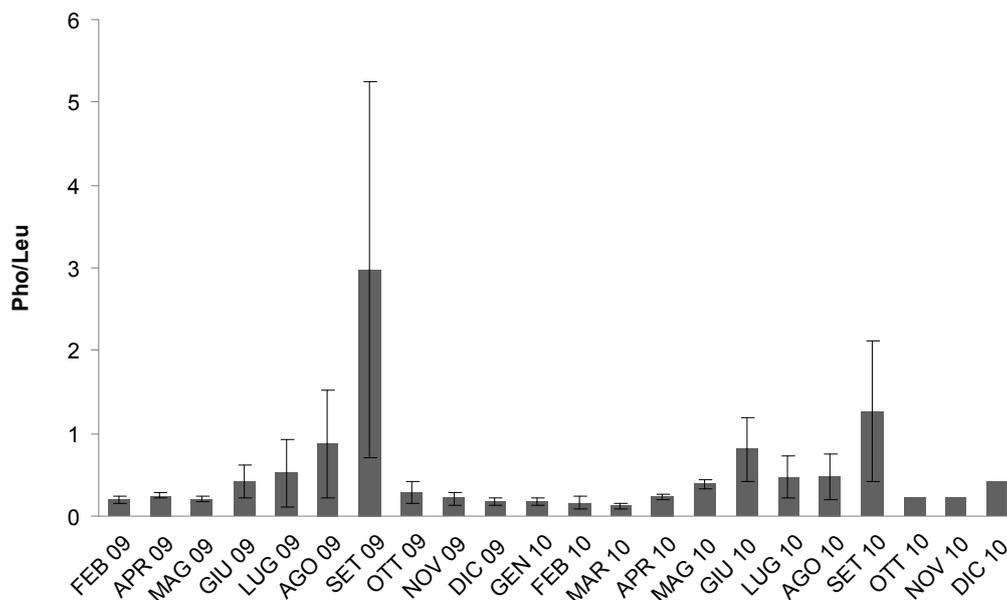


**Figura 5. Dinamica stagionale dell'attività aminopeptidasica (i dati di tutti i siti di campionamento sono stati mediati)**



**Figura 6. Correlazione tra aminopeptidasasi e nitrati nel Lago di Gerosa**

Nel Lago di Vico, il rapporto tra attività fosfataseica e aminopeptidasica è quasi sempre minore di uno (Figura 7), a conferma di una situazione in cui il fosforo non è limitante. Le concentrazioni di nutrienti alte e non limitanti per la comunità permettono a *P. rubescens* di crescere ed essere sempre presente ad alte concentrazioni: il ruolo della comunità batterica nel riciclo dei nutrienti sembra essere meno rilevante ai fini del mantenimento della fioritura.



**Figura 7. Dinamica stagionale dell'attività ectoenzimatica (i dati di tutti i siti di campionamento sono stati mediati) nel Lago di Vico**

Relativamente al livello di cianotossine presenti nei due laghi, i dati ottenuti dalle analisi LC-MS/MS sono stati espressi per semplicità solo come frazione totale (MC tot), essendo in entrambi i casi la percentuale di tossina disciolta sempre inferiore al 10% del totale. Anche il profilo dei congeneri prodotti dalle due popolazioni risulta essere molto simile: le MC-LF, -LW, -LA ed -LY non sono mai state rilevate; la MC-dem-RR risulta per entrambi i laghi il congenero più frequente e più abbondante (Tabella 3), anche se nel Lago di Vico le concentrazioni massime raggiunte sono in media più elevate di quelle riscontrate nel Lago di Gerosa. In circa il 48% dei campioni analizzati, le MC hanno infatti mostrato concentrazioni al di sopra di 1 µg/L raggiungendo anche valori pari a 54 µg/L nel caso di accumuli e schiume.

**Tabella 3. Abbondanze e range di concentrazioni dei congeneri rilevati**

Congenere	Lago di Gerosa		Lago di Vico		
	presenza % nei campioni	range di conc (µg/L)	presenza % nei campioni	range di conc (µg/L)	conc max in accumuli (µg/L)
MC-RR	49	Tracce – 0,1	58	Tracce – 0,1	0,2
dem-MC-RR	85	Tracce - 1	81	Tracce – 7,7	54
MC-LR	0	-	1	Tracce	0,02
dem-MC-LR	73	Tracce – 0,15	47	Tracce – 0,06	2,3
MC-YR	48	Tracce – 0,09	38	Tracce – 0,06	0,4

Nel Lago di Gerosa i livelli di MC tot hanno raggiunto i valori più elevati nei mesi di ottobre e dicembre, sia nei campioni di superficie che lungo la colonna, mostrando un andamento simile a quello delle densità di *P. rubescens*, ma mai totalmente sovrapponibile: i livelli massimi di tossine e densità di *P. rubescens* non sono mai risultati coincidenti, ma sfalsati di circa un mese. Inoltre nei campioni di superficie i livelli delle tossine diminuiscono nettamente fino quasi a

sparire nei mesi più caldi (primavera/estate), mentre rimangono rilevabili per tutto il periodo del campionamento nei campioni di profondità (Figura 8).

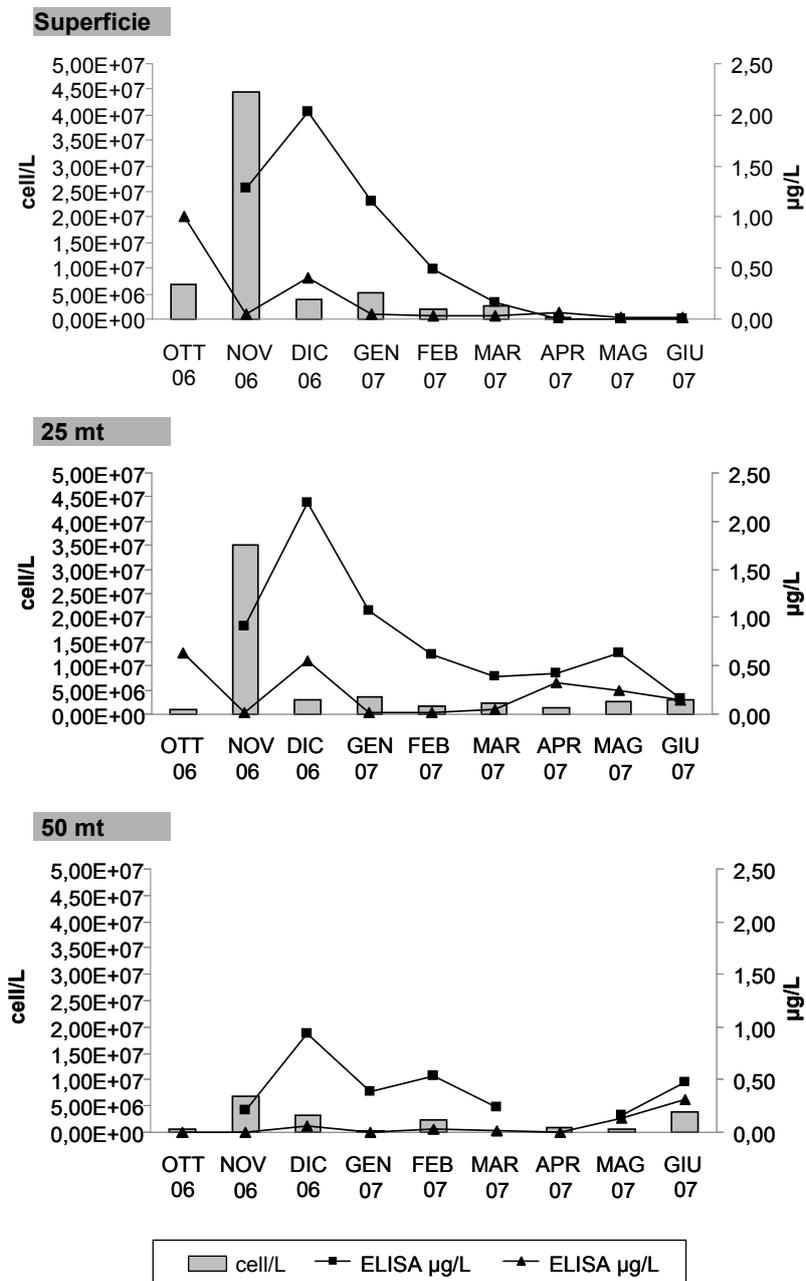
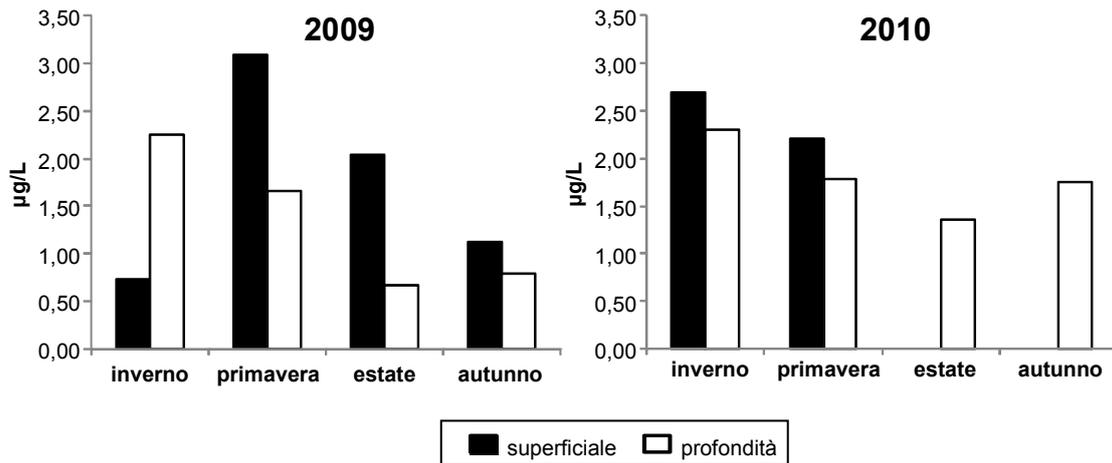


Figura 8. Dinamica di popolazione di *P. rubescens* e concentrazioni di MC tot nel Lago di Gerosa

È possibile infine notare come nella maggior parte dei campioni i valori delle MC tot rilevati con metodi LC-MS/MS ed ELISA abbiano trend molto simili, nonostante i valori rilevati con i metodi LC-MS/MS risultino spesso considerevolmente più bassi (Figura 9). Tale discrepanza potrebbe essere attribuita alla presenza di congeneri non ricercati in LC-MS/MS, o forse a

prodotti di degradazione delle microcistine, rilevati con il metodo immunologico. Il metodo ELISA infatti riconoscendo come aptene l'Adda, l'amminoacido specifico comune a tutte le microcistine, è in grado di rilevare qualsiasi frammento contenente tale amminoacido.

Per ciò che concerne il Lago di Vico, il contenuto di tossine segue abbastanza fedelmente l'andamento della densità di *P. rubescens*, ad eccezione dei campioni invernali e primaverili di profondità e di un campione primaverile superficiale del 2009 (Figura 9). Tale anomalia potrebbe in parte essere spiegata considerando il possibile contributo nella produzione di microcistine di *L. redekeii* (vedi Figura 4).



**Figura 9. Dinamica stagionale e annuale delle MC TOT nel Lago di Vico (i dati dei 3 siti superficiali e dei 2 siti di profondità sono stati mediati)**

Un'altra ipotesi plausibile per spiegare il potenziale tossico delle due comunità oggetto dello studio è legata alla composizione genotipica delle popolazioni.

L'analisi quantitativa delle due comunità cianobatteriche condotta mediante TNA assay ha evidenziato in entrambi i casi una composizione genotipica fortemente dinamica, poiché la frazione di individui tossici e non tossici ha mostrato oscillazioni ampie e repentine nei periodi di osservazioni effettuati.

Nel caso del Lago di Gerosa la frazione stimata di cellule *mcyB*-positive rispetto alla popolazione totale era compresa tra 0,31 e 0,79 in superficie, e incrementava con la profondità lungo la colonna d'acqua (25 m e 50 m), fino ad avere una popolazione interamente tossica. La frazione di individui tossici aumentava proporzionalmente alla densità di cellule, ad eccezione del periodo di fioritura (novembre 2006), in cui è stato rilevato il valore minimo (Figura 10) (Manganelli *et al.*, 2010). L'analisi quantitativa della composizione dei genotipi della comunità di *P. rubescens* nel Lago di Gerosa può aiutare a comprendere l'apparente discrepanza osservata nel mese di novembre in superficie tra la concentrazione di cellule, che raggiunge il picco massimo, e i bassi livelli di microcistine misurati mediante analisi LC-MS/MS ed ELISA. Focalizzando l'attenzione sulla percentuale di cellule tossiche, piuttosto che sul numero totale di individui, è stato possibile osservare che proprio nel mese di novembre in superficie la frazione di cellule *mcyB*-positive raggiungeva il valore minimo (0,31), giustificando quindi seppur parzialmente lo shift tra biomassa e tossina (Figura 10).

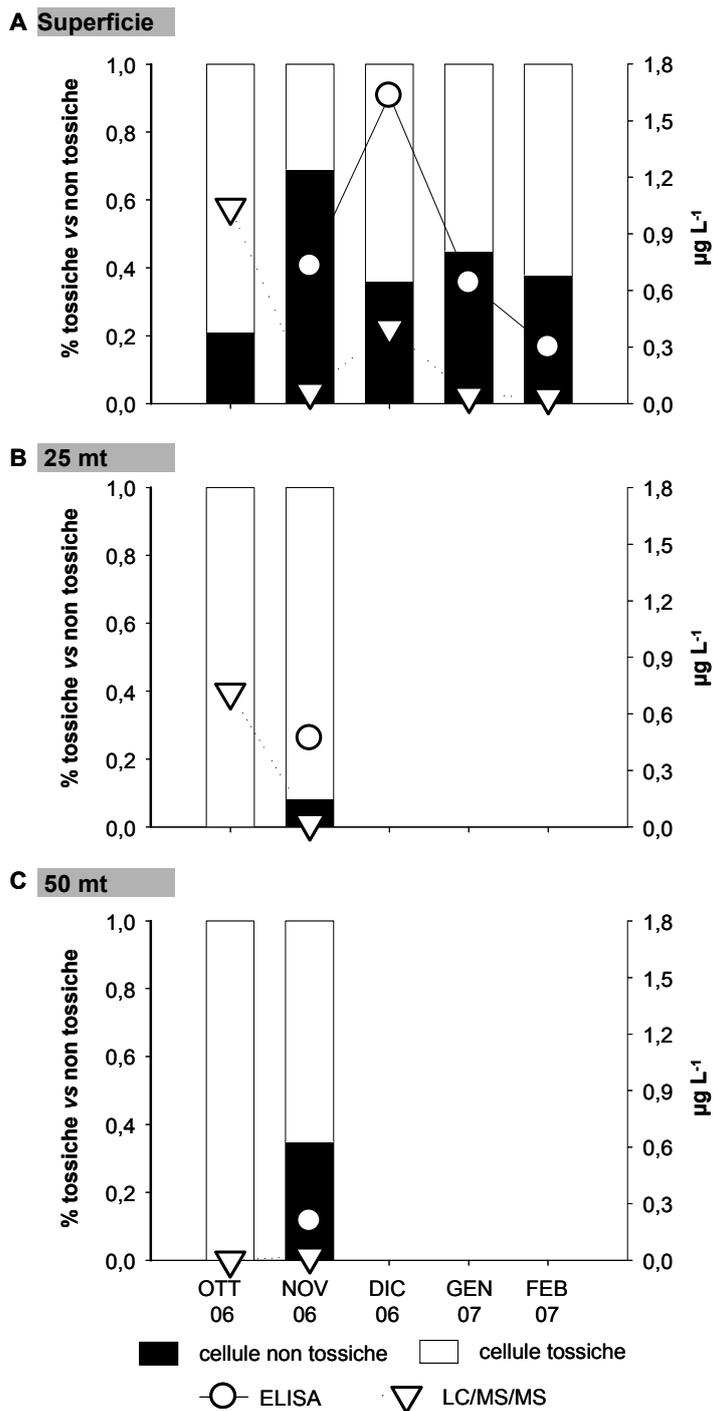
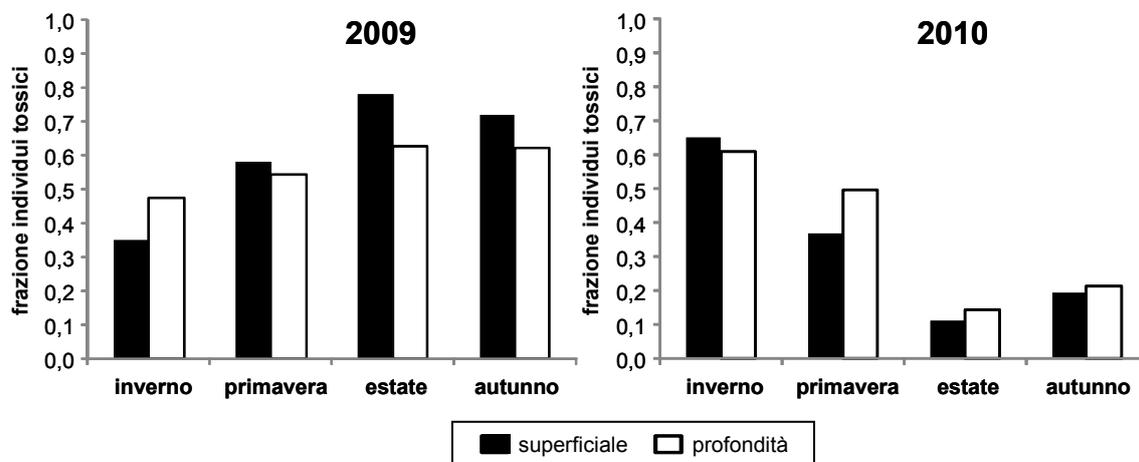


Figura 10. Frazione di cellule tossiche/non tossiche di *P. rubescens* (TNA assay) e concentrazione di MC (ELISA, LC-MS/MS) nel Lago di Gerosa nelle 3 stazioni di rilevamento

Alcuni autori hanno ipotizzato che in condizioni tali da favorire una fioritura possano aumentare i mutanti incapaci di produrre tossina tra le cellule *mcyB*-positive (Ostermaier & Kurmayer, 2009), o in alternativa che intervengano meccanismi di regolazione della trascrizione dell'mRNA che portano a una diminuzione dei livelli di trascritto dei geni *mcy* (Kaebernick *et al.*, 2000).

Nel Lago di Vico l'analisi molecolare mostrava una situazione molto diversa nella composizione dei genotipi della comunità: la percentuale di cellule potenzialmente produttrici di microcistine misurata era indipendente dalla profondità, essendo consistentemente elevata sia in superficie che lungo la colonna d'acqua in tutto il periodo di rilevamenti effettuati, mantenendosi oltre lo 0,5 nel 60% dei campioni. Il picco è stato misurato a marzo 2010 in una delle due stazioni di riva (Figura 11). Una caratteristica comune è una diminuzione, anche se in misura inferiore, della frazione tossica durante le fioriture (0,5 nel 75% dei casi).



**Figura 11. TNA assay: fluttuazioni stagionali di genotipi tossici di *P. rubescens* nel Lago di Vico (i dati dei 3 siti superficiali e dei 2 siti di profondità sono stati mediati)**

La presenza di altri cianobatteri come *L. redekeii*, potenzialmente in grado di rispondere alla reazione di amplificazione del marcatore *mcyB*, potrebbe in parte spiegare l'elevata percentuale di individui tossici osservata nel corso del primo anno di monitoraggio (Figura 4). Sono in corso studi per verificare la plausibilità di questa ipotesi.

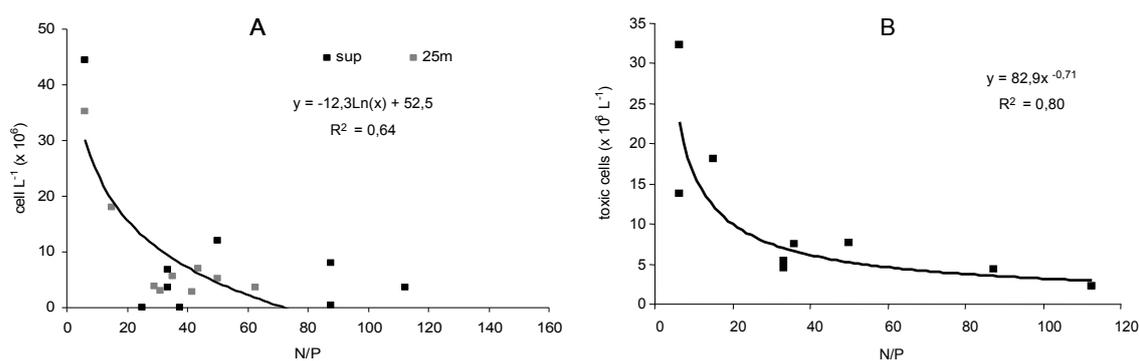
I dati di letteratura relativi a *Planktothrix* spp e *P. agardhii* (Kurmayer *et al.*, 2004; Briand *et al.*, 2008) riportano che entrambe le specie sono tipicamente caratterizzate da un'alta frazione di cellule tossiche (0,3-1), mentre in popolazioni di *Microcystis* questa frazione si presenta generalmente più bassa (0,05-0,38) e costante (Kurmayer *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2007).

I nostri dati, relativi a entrambe le comunità di *P. rubescens* monitorate, confermano che la frazione di individui tossici è alta e variabile, in particolare nei periodi di fioritura. La frazione di cellule produttrici di MC ha mostrato nel caso del Lago di Gerosa un andamento linearmente dipendente dalla densità, ad eccezione del bloom di superficie, in cui la frazione di individui tossici ha raggiunto il valore minimo rilevato.

Diverse ipotesi sono state avanzate per comprendere quali fattori ambientali possano regolare l'equilibrio tra le cellule tossiche e non tossiche in una popolazione, tali da determinare quello che sembra una fitness migliore per le cellule tossiche ad elevate biomasse. Esperimenti

su colture di *Microcystis* sembrano suggerire che in condizioni di scarsa intensità di luce, ad esempio durante una fioritura, in cui l'elevata biomassa ostacola la penetrazione dei raggi solari negli strati più profondi, le cellule non tossiche abbiano un vantaggio selettivo rispetto a quelle che producono tossina (Kaardinal *et al.*, 2007). Tuttavia i dati raccolti nel corso di entrambi i nostri studi sembrano escludere questa ipotesi, poiché nel Lago di Gerosa le più alte percentuali di individui tossici sono state misurate sotto il termoclino, ove l'intensità della luce è fortemente ridotta, mentre nel Lago di Vico l'andamento costante della frazione di individui tossici a tutte le profondità non permette di identificare un singolo fattore ambientale causale, ed è quindi più plausibile che diversi parametri possano entrare in gioco nell'equilibrio delle cellule tossiche/non tossiche all'interno della popolazione, attraverso un meccanismo di risposta comunque rapido. La tendenza ad una diminuzione della frazione di cellule MC-produttrici osservata in corrispondenza delle fioriture in entrambi gli studi può essere ricondotta a un maggior vantaggio adattativo delle cellule non tossiche in termini energetici, per il dispendio dovuto alla produzione di MC in una fase in cui le cellule sono principalmente impegnate nella riproduzione, anche se il mantenimento a livelli basali di una frazione di cellule tossiche può rappresentare in genere un vantaggio per le specie in termini di diversità biologica.

Il profilo della composizione genotipica della comunità di *P. rubescens* ha consentito di evidenziare alcune interessanti correlazioni tra la frazione di individui tossici misurata attraverso qPCR e la disponibilità dei nutrienti disciolti nel caso del Lago di Gerosa. In particolare, nei campioni prelevati in superficie e a -25 m, è stata osservata una correlazione negativa tra la densità delle cellule e il rapporto N/P totale (Manganelli *et al.*, 2010). Quando l'analisi è stata limitata alla frazione di individui tossici indipendentemente dalla profondità, la correlazione negativa è risultata ancora più evidente (Figura 12); una simile correlazione è stata osservata in un lago francese (Briand *et al.*, 2008) tra l'azoto totale e le cellule mcyA-positive in *P. agardhii*. Inoltre, è stata osservata una correlazione positiva tra cellule tossiche/non tossiche e P totale, che ha suggerito un possibile vantaggio competitivo per le cellule non tossiche in presenza di bassi livelli di fosforo totale. Nonostante sia riportato in alcuni lavori che un rapporto N/P > 16 è necessario affinché *P. agardhii* si affermi come specie dominante in una comunità cianobatterica e produca una fioritura (Teubner *et al.*, 1999), i nostri risultati indicano che bassi livelli di nutrienti non sono indicatori di basso rischio di proliferazione cianobatterica.



**Figura 12. Correlazione tra abbondanza di *P.rubescens* e rapporto N/P in superficie e a -25 m nel Lago di Gerosa (A); e correlazione tra frazione di cellule tossiche di *P. rubescens* e rapporto N/P nelle tre profondità (B)**

## Conclusioni

In conclusione, i nostri studi suggeriscono che non è possibile applicare uno stesso programma di monitoraggio a corpi idrici con differenti caratteristiche, mentre modelli *tailored-made* dovrebbero essere elaborati sulla base di studi preliminari utilizzando un approccio integrato che permetta di identificare i parametri chiave per effettuare una corretta valutazione del rischio. Infatti, la stima della densità delle cellule non è sempre un parametro indicativo per prevedere il potenziale tossico della popolazione, poiché il picco delle tossine può essere sfasato rispetto a quello dell'abbondanza cellulare, e la proporzione di genotipi tossici può variare nel tempo anche in modo repentino, alterando il livello di produzione delle tossine. Inoltre condizioni generalmente oligotrofiche non sono necessariamente un indice di basso rischio di proliferazione di cianobatteri, in quanto *P. rubescens* è in grado di dar luogo a fioriture anche in presenza di bassi livelli di nutrienti disciolti (come nel caso del Lago di Gerosa). D'altra parte, quando il livello dei nutrienti è sufficientemente elevato, la stagionalità di *P. rubescens* non si limita ai mesi più freddi, come dimostrato dalla presenza di fioriture superficiali nel Lago di Vico anche in primavera inoltrata. Si ritiene inoltre opportuno segnalare che, in presenza di *P. rubescens*, in caso di captazione di acque per uso potabile, è necessario monitorare le acque al di sotto del termocline, dove la proporzione di cellule produttrici di MC può essere più elevata che in superficie, durante tutto l'anno. Infine è utile sottolineare che, ai fini di un monitoraggio di routine da parte delle strutture periferiche, è opportuno applicare un metodo aspecifico (come il test immunoenzimatico ELISA) a scopo di screening, in modo da avere una globale indicazione del contenuto totale di cianotossine. Solo per studi e approfondimenti più sofisticati, in presenza di livelli tali da destare preoccupazione, è opportuno ricorrere a un sistema di rilevazione con tecniche LC-MS/MS per ottenere un profilo degli specifici congeneri, ciascuno con differente potenziale tossico.

## Bibliografia

- APAT (Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici), IRSA-CNR (Istituto di Ricerca sulle Acque-Consiglio nazionale delle Ricerche). *Metodi analitici per le acque*. Roma: APAT; 2003. (Manuali e Linee Guida APAT 29/2003)
- Briand E, Gugger M, François, JC, Bernard C, Humbert JF, Quiblier C. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) population. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:3839-48.
- Chorus I, Bartram J. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequence, monitoring and management*. London: E&FN SPON; 1999.
- CNR-IRSA-ISE. *LIMNO database della qualità dei dati italiani*. Consiglio Nazionale delle Ricerche; Istituto di Ricerca Sulle Acque; Istituto per lo Studio degli Ecosistemi; 2004. Disponibile all'indirizzo <http://www.ise.cnr.it/limno/limno.htm>; ultima consultazione 27/9/11.
- Codd GA, Morrioso LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta- N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5074-8.
- Funari E, Scardala S, Testai E (Ed.). *Cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/6).

- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-126.
- Gkelis S, Harjunpää V, Vardaka Y, Lanaras T, Sivonen K. Occurrence of microcystins in Greek water blooms and isolated strains. In: *5<sup>th</sup> Int. Conf. Toxic Cyanobacteria*. Noosa, Queensland, Australia, 15-20 July 2001.
- Hollibough JT, Azam F. Microbial-degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol Oceanogr* 1983;28:1104-16.
- Hoppe HG. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl substrate. *Mar Ecol Prog Ser* 1983;11:299-308.
- Jacquet S, Briand JF, Leboulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, Tassin B, Vinçon-Leite B, Paolini G, Druart J-C, Anneville O, Humbert J-F. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* 2005;4:651-72.
- Jespersen AM, Christoffersen K. Measurements of Chl-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Arch Hydrobiol* 1987;109:445-54.
- Kaebnick M, Neilan BA, Borner T, Dittmann E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3387-92.
- Kardinaal WEA, Tonk L, Janse I, Hol S, Slot P, Huisman J, Visser PM. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:2939-46.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* 2004;6:831-41.
- Kurmayer R, Dittman E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol* 2002;43:107-18.
- Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high performance-liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 1994;199:1525-30.
- Legnani E, Copetti D, Oggioni A, Tartari G, Palumbo M-T, Morabito G. *Planktothrix rubescens*' seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy). *J Limnol* 2005;64:61-73.
- Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Vichi S, Mattei D, Bogialli S, Ceccarelli P, Corradetti E, Petrucci I, Gemma S, Testai E, Funari E. Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Research* 2010;44:1297-306.
- Mühling M, Fuller NJ, Millard A, Somerfield PJ, Marie D, Wilson WH, Scanlan DJ, Post AF, Joint I, Mann NH. Genetic diversity of marine Synechococcus and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environ Microbiol* 2005;7(4):499-508.
- Ostermaier V. and Kurmayer R. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microb Ecol* 2009;58(2):323-33.
- Porter J, Morrison SA, Pickup RW. Effect of trophic status on the culturability and activity of bacteria from a range of lakes in the English Lake District. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2072-8.
- Quiros R. The relationship between nitrate and ammonia concentrations in the pelagic zone of lakes. *Limnetica* 2003;22:37-50.
- Rohrlach T, Christoffersen K, Hansen PE, Zhang W, Czarnecki O, Henning M, Fastner J, Erhard M, Neilan BA, Kaebnick M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of Microviridin J, a new Microcystis metabolite toxic to Daphnia. *J Chem Ecology* 2003;29:1757-70.

- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.), *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequence, monitoring and management*. London: E&FN SPON; 1999. p. 41-111.
- Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, Hosoda N, Hiroishi S. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol Lett* 2007;266:49-53.

# **MONITORAGGIO DI UN'AREA URBANA DI ROMA: STUDIO DELL'ANDAMENTO ANNUALE E STAGIONALE DEI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI**

Marco De Felice, Roberta Morlino, Sergio Fuselli  
*Reparto Igiene degli ambienti di vita, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## **Introduzione**

Il monitoraggio dei Composti Organici Volatili (COV) di natura alifatica, aromatica e carbonilica, è stato effettuato utilizzando la stazione di rilevamento degli inquinanti atmosferici dell'Istituto Superiore di Sanità.

Tale stazione è ubicata in zona semicentrale, al margine di una strada ampia, a libera circolazione, dove circolano mezzi pubblici sia su gomma a trazione diesel che su rotaia ad alimentazione elettrica. Il traffico veicolare privato rappresenta la fonte principale di emissioni, dovuto in larga parte agli utenti delle strutture pubbliche site nelle vicinanze (strutture ospedaliere, università, istituti di ricerca). Non si riscontrano sorgenti emmissive di origine industriale. I campionatori utilizzati per il monitoraggio sono stati posti a circa 5 metri dal ciglio stradale e ad un'altezza di 2,5 metri dal suolo.

Gli analiti ricercati sono stati scelti poiché inseriti, come altri COV, dalla Direttiva 2008/50/CE, dell'11 giugno 2008, tra le sostanze da monitorare nelle aree urbane e suburbane, la cui misurazione è necessaria poiché implicate nelle reazioni chimiche che nell'atmosfera portano alla formazione dell'ozono.

## **Alifatici e aromatici**

### **Caratteristiche generali**

#### **Benzene, toluene, etilbenzene, xileni**

Si presentano in natura allo stato liquido, sono in genere incolori o giallo chiari, volatili e dal caratteristico odore dolciastro. A causa della loro alta pressione di vapore e scarsa solubilità, se dispersi nell'ambiente evaporano dalla miscela in cui sono presenti. Sono facilmente infiammabili, irritanti per la pelle e il sistema respiratorio. Si trovano normalmente nei derivati del petrolio e sono usati industrialmente come solventi per lubrificanti, gomme, detergenti, farmaci, grassi, oli, vernici, colle, coloranti, insetticidi e intermedi di sintesi per la produzione di plastiche, resine e fibre sintetiche. Sono tra i COV presenti nelle combustioni di materiale vegetale (legno, tabacco) e dei combustibili quali benzina e gasolio.

#### **Esano, eptano**

In natura si presentano come liquidi incolori dall'odore caratteristico e altamente infiammabili. Il vapore è più pesante dell'aria, ciò li rende pericolosi per il rischio di accensioni a distanza. Si trovano nelle vernici, nei solventi per tinte e pitture, nelle colle, nei prodotti per

lavanderie, negli impermeabilizzanti per mobili e arredi, nei gas provenienti da combustioni (sigaretta, carbone), prodotti per belle arti (argille, colori a tempera).

### **Trimetilbenzeni**

Sono liquidi incolori con odore caratteristico, altamente infiammabili. Reagiscono violentemente con ossidanti causando potenzialmente incendi ed esplosioni, per combustione producono fumi tossici e irritanti. Si trovano nei fitosanitari, solventi per vernici, diluenti.

## **Effetti per la salute**

### **Benzene**

È classificato come cancerogeno di classe 1 per l'uomo. Il suo effetto principale a lungo termine è a carico del midollo osseo e del sistema immunitario. Può provocare leucemie, emorragie, anemie, cancro degli organi preposti alla formazione delle cellule ematiche, infertilità, cicli mestruali irregolari, malformazioni degli organi atti alla riproduzione. È una sostanza tossica, i cui vapori sono più pesanti dell'aria, così da concentrarsi in prossimità del suolo, si dissolve lentamente in acqua e tende a restare a galla. L'inalazione dei vapori può provocare sonnolenza, vertigini, cefalea, perdita di coscienza, tremori, battito cardiaco irregolare o accelerato.

### **Toluene**

È una sostanza nociva, che può provocare danni ai polmoni. L'inalazione dei vapori può provocare sonnolenza e vertigini. L'esposizione colpisce principalmente il sistema nervoso centrale (disfunzioni cognitive e psicomotorie, atrofia, atassia), fegato e reni. Sostituisce industrialmente il più tossico benzene.

### **Etilbenzene e xileni**

La composizione della miscela derivata dal petrolio contiene m-xilene al 40% e o-xilene, p-xilene ed etilbenzene al 20%. Sono sostanze nocive per inalazione e irritanti a contatto con la pelle, gli occhi e le mucose delle vie aeree.

### **Esano, eptano**

Il vapore è irritante per gli occhi, la cute e il tratto respiratorio. Possono avere effetti sul sistema nervoso centrale, l'inalazione può provocare vertigini, sonnolenza, debolezza, stato di torpore.

### **Trimetilbenzeni**

I polmoni possono essere danneggiati per un'esposizione ripetuta o prolungata, causando bronchite cronica. Hanno effetti sul sangue, le vie respiratorie e il sistema nervoso centrale, causando stato confusionale, tosse, vertigini, sonnolenza, mal di testa, mal di gola, vomito.

## **Materiali e metodi**

### **Campionamento**

Il campionamento di tipo passivo dei COV è stato eseguito mediante campionatori diffusivi radiali (Radiello®). Il Radiello® è costituito da una cartuccia cilindrica in rete di acciaio

inossidabile con un diametro di 5,9 mm contenente 530 mg di carbone attivo (35-50 mesh). Durante il campionamento, la cartuccia è collocata all'interno di un corpo diffusivo cilindrico microporoso in policarbonato e polietilene montato su un supporto di policarbonato.

## Analisi

La cartuccia adsorbente, dopo il campionamento, è desorbita con 2 mL di disolfuro di carbonio (Fluka) per cromatografia e sottoposta per 30 minuti ad agitazione meccanica. La determinazione analitica degli inquinanti è effettuata con il metodo dello standard esterno, con una miscela standards in metanolo.

La determinazione analitica dei COV è stata eseguita iniettando aliquote di 2 µL di soluzione, con campionatore automatico, in un gas-cromatografo Agilent Technologies mod. 6980 con rivelatore uno Spettrometro di Massa (Agilent Technologies mod. 5973N) settato con la temperatura del filamento (sistema ionizzante) pari a 230°C, energia di ionizzazione pari a 69,9 eV, corrente di emissione pari a 34 µA, temperatura del rivelatore a quadrupolo pari a 150°C. Le condizioni gas cromatografiche impiegate prevedono un flusso costante di elio ultrapuro ad 1,6 mL/min. Il processo di separazione cromatografica è stato eseguito utilizzando una colonna J&W DB-624 Durabond (6% Cianopropile - 94% Dimetilepolisilossano, 60 m; 0,25 mm d.i.; 1.40 mm spessore di film). La temperatura del forno è stata così programmata: isoterma iniziale a 35°C per 3 min; gradiente di temperatura di 5°C/min fino a 100°C (isoterma per 1 min); gradiente di temperatura di 10°C/min fino a 240°C (isoterma per 3 min). Il limite di rilevabilità del metodo, considerando un periodo di campionamento di 15 giorni è stato: 0,031 µg/m<sup>3</sup> per il benzene, 0,013 µg/m<sup>3</sup> per il toluene, 0,014 µg/m<sup>3</sup> per l'etilbenzene e 0,015 µg/m<sup>3</sup> per gli xileni. Il limite di rilevabilità della procedura analitica basato su un rapporto segnale/rumore di fondo maggiore di 3 è stato: 0,25 µg/mL per il benzene, 0,10 µg/mL per il toluene, l'etilbenzene e gli xileni.

## Risultati

La Tabella 1 mostra i valori medi e il range dei valori di concentrazione nel complessivo periodo di campionamento (gennaio 2003 – dicembre 2009) e i valori di concentrazione stagionali (primavera, estate, autunno, inverno) dei COV presi in esame.

**Tabella 1. Valori medi e statistiche di base rilevati nel periodo di osservazione (gennaio 2003-dicembre 2009). Concentrazioni espresse in µg/m<sup>3</sup> (n.=132)**

COV	Media	DS	CV%	Min	Max	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
Esano	5,3	1,3	23,7	2,4	10,0	5,3	4,9	6,2	5,0
Metilciclopentano	2,4	0,6	24,5	1,1	4,4	2,3	2,3	2,7	2,4
Cloroformio	0,3	0,1	38,1	0,1	0,7	0,3	0,3	0,3	0,3
2-metilesano	2,3	0,7	29,9	0,2	4,5	2,2	2,0	2,6	2,3
Cicloesano	2,7	1,2	43,6	0,6	6,8	2,6	2,3	3,2	2,5
Benzene	2,8	1,2	41,4	1,0	6,9	2,3	1,8	3,5	3,7
Eptano	2,4	0,8	31,8	0,1	4,1	2,3	2,1	2,7	2,7
Tricloroetilene	0,3	0,1	39,7	0,1	0,8	0,3	0,4	0,3	0,4
Metilcicloesano	0,7	0,3	40,2	0,1	1,6	0,7	0,7	0,7	0,6
Toluene	10,7	3,9	36,7	4,4	21,5	9,1	8,0	14,3	12,1
Tetracloroetilene	1,6	0,6	37,5	0,6	4,0	1,4	1,4	2,1	1,6
Etilbenzene	1,5	0,6	41,0	0,4	3,7	1,3	1,1	2,0	1,7
m- p- xilene	2,6	1,2	47,3	0,3	6,3	2,2	1,7	3,5	3,1
o- xilene	1,8	0,7	41,9	0,6	4,3	1,5	1,2	2,3	2,0
1,2,4-trimetilbenzene	2,2	1,0	46,7	0,6	6,9	1,8	1,6	2,9	2,5

Le medie e le statistiche sono riferite a periodi di prelievo della durata di 14 giorni.

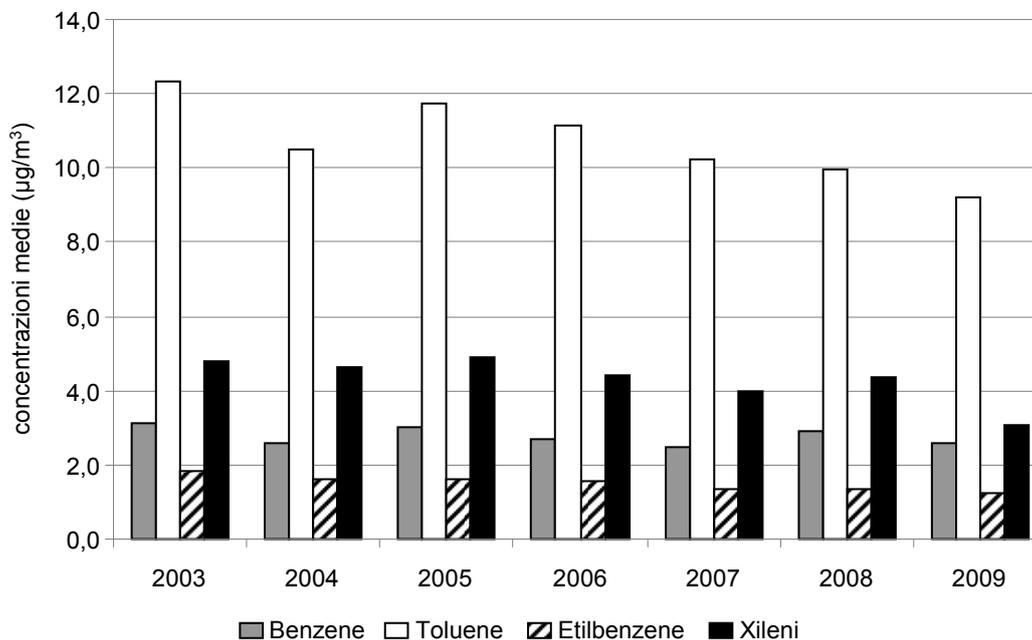
In particolare nella Tabella 2 si mettono in evidenza i valori delle concentrazioni mensili del benzene nei 7 anni di rilevamento.

Confrontando questi ultimi valori delle concentrazioni mensili (Tabella 2), si riscontra che gli andamenti dei valori di concentrazione presentano un profilo mensile simile, con punte massime del benzene nei mesi di gennaio, febbraio, novembre e dicembre.

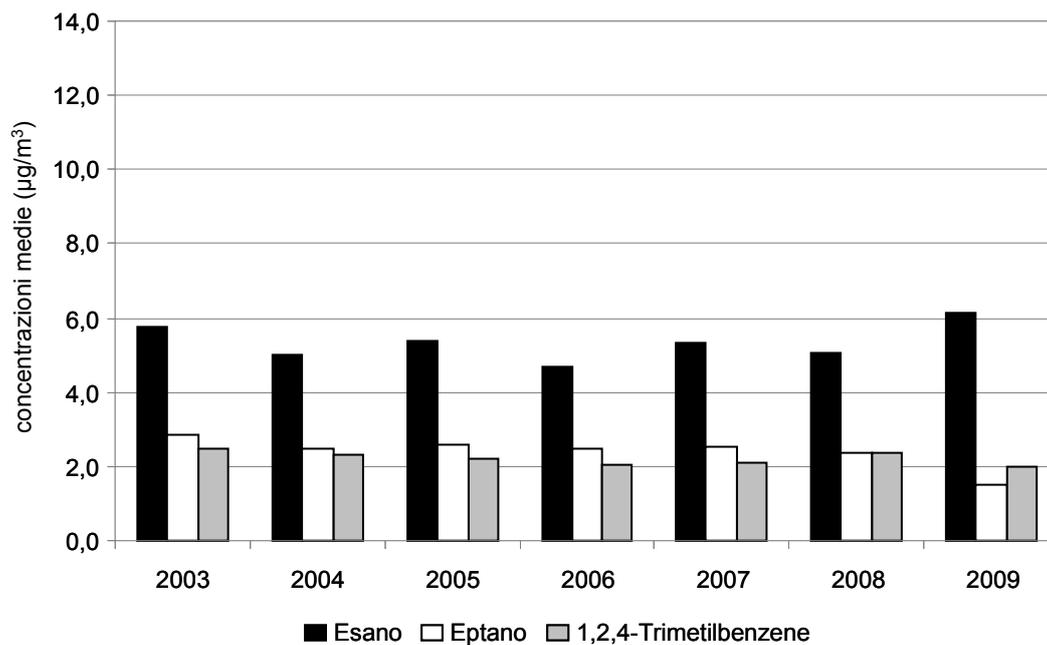
**Tabella 2. Benzene: raffronto delle concentrazioni medie ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) mensili nel periodo di riferimento 2003-2009**

Mese	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Gennaio	4,3	3,5	4,7	4,0	4,9	3,1	4,9
Febbraio	4,2	3,3	3,5	3,0	3,5	3,4	3,5
Marzo	4,0	3,0	3,2	3,1	3,6	3,8	2,6
Aprile	2,6	2,1	2,2	2,0	2,2	2,4	2,2
Maggio	2,7	1,9	2,0	1,7	1,8	2,2	1,7
Giugno	2,5	2,0	2,4	2,2	1,5	1,7	1,5
Luglio	2,0	2,0	2,3	1,4	1,9	1,1	1,6
Agosto	1,4	1,2	1,4	1,1	1,1	1,0	1,7
Settembre	2,5	2,2	2,7	2,3	2,3	2,6	1,8
Ottobre	3,2	3,2	4,0	3,1	3,3	3,8	3,2
Novembre	3,0	5,0	4,6	4,9	2,5	4,8	3,9
Dicembre	3,5	5,1	3,5	5,6	2,5	4,3	3,3
Valori medi	3,1	2,6	3,0	2,7	2,5	2,9	2,7

Le Figure 1 e 2 mostrano l'andamento medio annuale dei valori delle concentrazioni dei COV che sono indicati come precursori dell'ozono, nel periodo di riferimento 2003-2009.

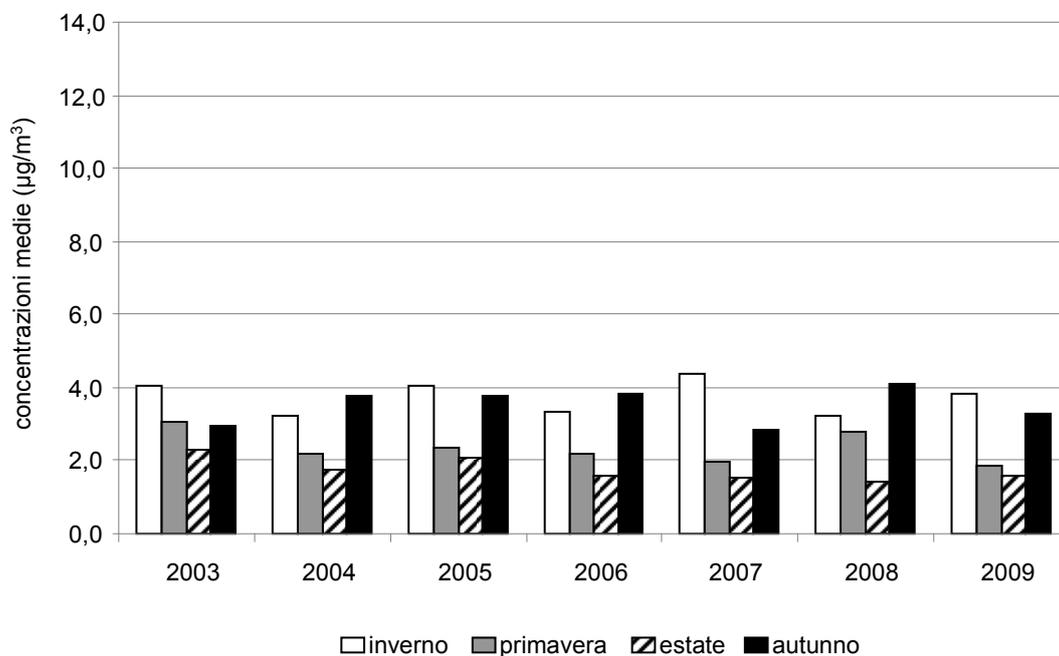


**Figura 1. Benzene, toluene, etilbenzene, xileni: concentrazioni medie ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) annuali nel periodo di riferimento 2003-2009**



**Figura 2. Esano, eptano, 1,2,4-trimetilbenzene: concentrazioni medie (µg/m<sup>3</sup>) annuali nel periodo di riferimento 2003-2009**

La Figura 3 mostra il confronto dei valori medi stagionali del benzene per ogni anno nel periodo di riferimento 2003-2009.



**Figura 3. Benzene: concentrazioni medie stagionali (µg/m<sup>3</sup>), nel periodo di riferimento 2003-2009**

## Conclusioni

I COV nel periodo di monitoraggio hanno evidenziato i seguenti range di concentrazione (minimo – massimo): toluene 4,4-21,5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , etilbenzene 0,4-3,7  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , orto xilene 0,6-4,3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , meta e para xilene 0,3-6,3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , esano 2,4-10,0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , eptano 0,1-4,1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , 1,2,4-trimetilbenzene 0,6-6,9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , con i seguenti valori medi: toluene  $10,7 \pm 3,9$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , etilbenzene  $1,5 \pm 0,6$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , orto xilene  $1,8 \pm 0,7$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , meta e para xilene  $2,6 \pm 1,2$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , esano  $5,3 \pm 1,3$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , eptano  $2,4 \pm 0,8$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , 1,2,4-trimetilbenzene  $2,2 \pm 1,0$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Considerando in particolare i valori di concentrazione del benzene, si riscontra un range di concentrazione (minimo – massimo) 1,0-6,9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , con un valore medio di  $2,8 \pm 1,2$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (vedi Tabella 1). Complessivamente è stato riscontrato un valore medio negli 84 mesi monitorati (vedi Tabella 2), sempre inferiore al limite di 5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , valore indicato nella Direttiva 2008/50/CE come obiettivo da raggiungere entro gennaio 2010. Fanno eccezione i mesi di dicembre 2004 e dicembre 2006 dove i valori di concentrazione del Benzene sono di poco superiore.

## Composti carbonilici

### Caratteristiche generali

La formaldeide si presenta allo stato naturale come gas, avente un punto di ebollizione di  $-21^\circ\text{C}$ , con odore pungente e irritante, appartiene alla categoria delle sostanze organiche volatili.

È commercializzata generalmente in soluzione acquosa al 30-50% in peso, utilizzata come disinfettante (formalina), per conservare materiale biologico o alimentare (E-240). La maggiore parte della formaldeide prodotta industrialmente è destinata alla produzione di resine termoindurenti polimeriche, laminati plastici, adesivi e schiume isolanti, come agente conciante (concia alle aldeidi delle pelli), conservante per il legno, colle e vernici, solvente per cosmetici.

Nelle abitazioni si ritrova prevalentemente nei mobili in legno truciolato e compensato, manufatti in MDF (*Medium-Density Fiberboard*), soprattutto quando sono nuovi, ma anche l'abbigliamento e le tappezzerie, essendo la formaldeide utilizzata nelle stampe dei tessuti, possono essere fonti emissive; essa è quindi molto diffusa negli inquinanti di interni.

Inoltre c'è da considerare il contributo che l'individuo può dare all'emissione di formaldeide nella propria abitazione, essenzialmente come sottoprodotto di processi di combustione (il fumo di sigaretta, incensi, profumanti per la casa, gas alimentare).

L'acetaldeide (etanale) a temperatura ambiente è un liquido incolore, volatile e infiammabile, i cui vapori sono pungenti e irritanti. Utilizzata soprattutto per le sintesi organiche industriali. Anch'essa è un sottoprodotto delle varie combustioni naturali (incendi boschivi) o di natura antropogenica (camini, trattamenti alimentari, sigarette, raffinazione del carbone, stufe a legna).

Gli altri composti carbonilici sono composti non associati a tumori nell'uomo, ma tutti potenzialmente nocivi e irritanti per inalazione. Questi sono utilizzati industrialmente come solventi o per la produzione di farmaci, materie plastiche, profumi, coloranti e si producono spontaneamente nelle reazioni associate a combustioni naturali o di origine antropogenica.

### Esposizione

L'esposizione alla formaldeide è una funzione dell'ambiente in cui essa è rilevata. In ambienti indoor si ha un range medio di 10-70  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , a seconda del tipo dei materiali utilizzati per la costruzione e l'arredamento e le abitudini degli occupanti. Per l'outdoor si ha un range

medio di 1-10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , a seconda ci si trovi in una zona rurale o urbana, in funzione del traffico veicolare, delle condizioni atmosferiche e da emissioni artigianali e/o industriali.

### Effetti per la salute

La formaldeide è classificata come cancerogena di classe 1 (agente cancerogeno per l'uomo) dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC).

L'agenzia americana *Environmental Protection Agency* (US EPA), definisce per la formaldeide, un indice di rischio di cancerogenicità per un'esposizione dovuta ad inalazione (*Inhalation Unit Risk*) di  $1,3 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , ovvero il rischio di contrarre un tumore, in un'ipotetica popolazione nella quale tutti gli individui sono costantemente esposti, per tutto il loro tempo di vita, ad un'esposizione di 1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . La pericolosità della formaldeide è legata prevalentemente alla sua volatilità, infatti, la via di penetrazione principale è quella respiratoria (naso, gola). L'effetto irritante è avvertibile già a concentrazioni molto basse. L'esposizione, specie se prolungata, può provocare anche effetti sul sistema nervoso centrale, con stanchezza, emicranie, nausea, sonnolenza, vertigini. Inoltre può diventare un allergene, scatenando una reazione immunitaria con produzione di anticorpi IgE e relativo edema, infiammazione, lacrimazione, gola dolorante e formicolio al naso.

L'acetaldeide è classificata dalla IARC come cancerogeno di classe 2B (possibile carcinogeno per l'uomo). Come per la formaldeide agisce per lo più come agente irritante per le prime vie aeree (naso, gola) e occhi.

L'intossicazione cronica da acetaldeide da sintomi simili all'alcolismo (vista annebbiata e stati di incoscienza), infatti essa è uno dei principali sottoprodotti della ossidazione dell'etanolo che avviene nel fegato.

Gli altri composti carbonilici, hanno effetti che vanno dal moderatamente tossico al fortemente irritante per occhi, naso, gola e pelle. Alcuni hanno un'attività depressiva del sistema nervoso centrale: acetone e benzaldeide hanno effetti narcotici; la propionaldeide può provocare convulsioni e dispnea; la valeraldeide debolezza muscolare e atassia. Sono stati poco studiati gli effetti a lungo termine ad una loro esposizione, per cui nessuno è classificato come cancerogeno.

### Legislazione

Il recepimento nella normativa italiana inizia con il DPR del 10 settembre 1982, n. 904. "Attuazione della direttiva 76/769/CEE relativa alla immissione sul mercato e all'uso di talune sostanze e preparati pericolosi".

Successivamente la Circolare n. 57 del Ministero della Sanità del 22 giugno 1983, "Usi della formaldeide: rischi connessi alle possibili modalità di impiego", prevede che "la formaldeide potrà continuare ad essere utilizzata a condizione che i produttori assicurino il rispetto delle cautele, in attesa che un'adeguata normativa venga definita. Resta valido in ogni caso, in via sperimentale e provvisoria il limite massimo di esposizione di 0,1 ppm (0,124  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) negli ambienti di vita e di soggiorno nei quali i materiali compensati, pannelli truciolati, di conglomerati in sughero siano stati utilizzati". In seguito il D.M. del 15/04/1994 recepisce la norma UNI EN 712-2 come metodo analitico per la determinazione e il limite di rilascio per gli arredi in legno (3,5  $\text{mg}/\text{m}^2 \times \text{h}$ ), inserendo la formaldeide tra gli inquinanti di interesse prioritario.

Il successivo DL.vo 351/1999, inserisce la formaldeide negli inquinanti che sono disciplinati dalle direttive della Comunità Europea, indicando gli "inquinanti da considerare nel quadro della valutazione e della gestione della qualità dell'aria ambiente", definendo le modalità di

definizione dei criteri di valutazione. Con l'approvazione del Decreto Ministeriale 10 ottobre 2008, "Disposizioni atte a regolamentare l'emissione di aldeide formica da pannelli a base di legno e manufatti con essi realizzati in ambienti di vita e soggiorno". Pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale* n 288 del 10/12/2008, Serie Generale, pagine 31/34, è stato fissato un limite di emissione dai pannelli di legno di 0,1 ppm. La formaldeide è stata inserita, come altri COV, dalla Direttiva 2008/50/CE, dell'11 giugno 2008, tra le sostanze da monitorare nelle aree urbane e suburbane, la cui misurazione è necessaria poiché implicate nelle reazioni chimiche che nell'atmosfera portano alla formazione dell'ozono.

## Materiali e metodi

### Campionamento

Il campionamento di tipo passivo dei composti carbonilici è stato effettuato mediante campionatori diffusivi radiali (Radiello®). Il Radiello® per i composti carbonilici è costituito da una cartuccia adsorbente in rete cilindrica di acciaio inossidabile (100 mesh) con diametro pari a 5,9 mm contenente 900 mg di Florisil (35-50 mesh) rivestito con 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH).

La cartuccia è contenuta in un corpo diffusivo cilindrico di polietilene microporoso sintetizzato montato su un supporto di policarbonato.

### Analisi

La cartuccia adsorbente, dopo il campionamento, viene desorbita con 2 mL di acetonitrile (Carlo Erba) per cromatografia e sottoposta per 30 minuti ad agitazione meccanica e successivamente filtrata con filtri Mille GV da 0,22 µm. La determinazione analitica degli inquinanti viene effettuata con il metodo dello standard esterno. La calibrazione è stata effettuata attraverso l'iniezione di standards di idrazoni solidi dissolti in acetonitrile (Carlo Erba).

Le analisi quali-quantitative sono state effettuate utilizzando un HPLC (Agilent Technologies 1100 Series) con rivelatore UV, equipaggiato con una colonna impaccata Restek Ultra C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm).

Il volume di ogni singolo campione iniettato è di 20 µl. Le condizioni di eluizione impiegate prevedono un flusso iniziale della fase mobile acqua/acetonitrile 1,8 mL/min con un rapporto percentuale 52/48 per i primi 5 minuti, poi con gradiente di eluizione (da 5 a 20 minuti) con un incremento dell'acetonitrile fino al 100%. La rivelazione degli analiti è stata effettuata con rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 365 nm.

## Risultati

La Tabella 3 mostra i valori medi e il range dei valori di concentrazione nel complessivo periodo di campionamento (gennaio 2006 – dicembre 2009) e i valori di concentrazione stagionali (primavera, estate, autunno, inverno) dei composti carbonilici presi in esame.

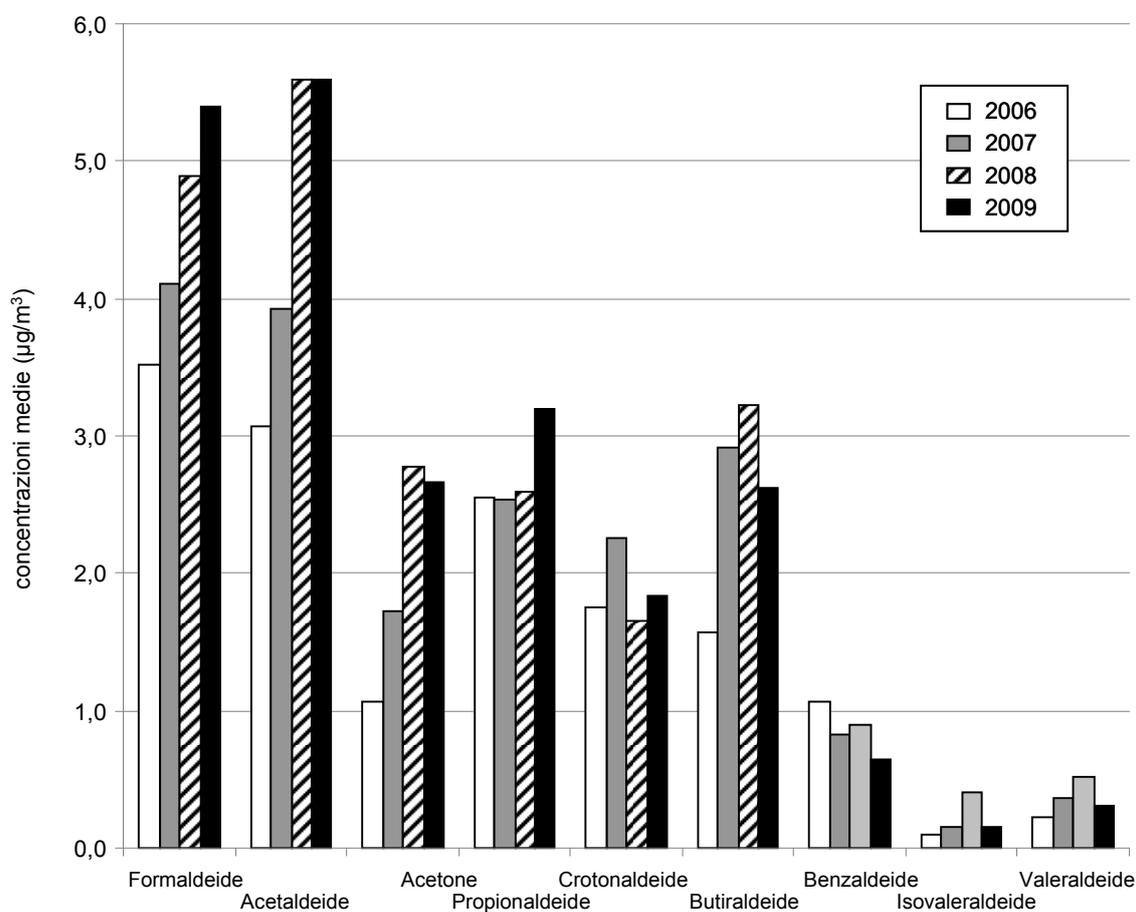
La Figura 4 mostra l'andamento medio annuale dei valori delle concentrazioni dei composti carbonilici nel periodo di riferimento 2006-2009.

La Figura 5 mostra il confronto dei valori medi stagionali della formaldeide per ogni anno nel periodo di riferimento 2006-2009.

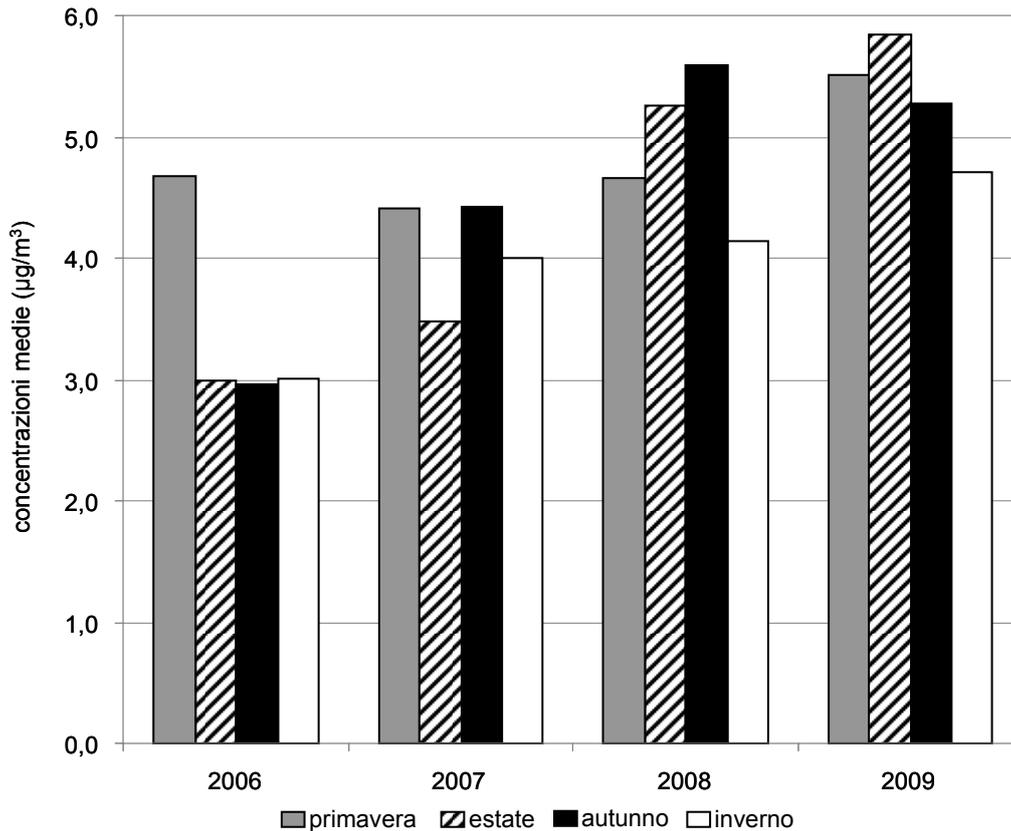
**Tabella 3. Composti carbonilici: valori medi e statistiche di base rilevati nel periodo di osservazione (gennaio 2006-dicembre 2009). Concentrazioni espresse in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (n.=73)**

Analiti	Media	DS	CV%	Min	Max	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
Formaldeide	4,3	1,6	37,2	1,2	10,3	4,6	4,0	4,7	3,7
Acetaldeide	3,9	2,4	61,5	0,7	13,0	4,4	2,6	4,9	3,4
Acetone	2,1	0,9	44,0	0,5	5,5	2,0	2,2	2,1	1,9
Propionaldeide	2,7	1,4	52,6	0,3	7,7	3,5	2,1	2,6	2,7
Crotonaldeide	1,9	0,9	49,5	0,5	4,7	2,2	1,7	1,7	1,9
Butiraldeide	2,6	1,0	38,7	0,4	4,9	3,0	2,6	2,2	2,4
Benzaldeide	0,9	0,6	74,3	0,1	2,9	1,1	0,6	0,9	0,9
Isovaleraldeide	0,2	0,1	61,2	0,1	1,0	0,2	0,3	0,1	0,2
Valeraldeide	0,4	0,2	55,8	0,1	1,5	0,3	0,3	0,4	0,3

Le medie e le statistiche sono riferite a periodi di prelievo della durata di 14 giorni.



**Figura 4. Composti carbonilici: concentrazioni medie ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) annuali nel periodo di riferimento 2006-2009**



**Figura 5. Formaldeide: concentrazioni medie stagionali ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), nel periodo di riferimento 2006-2009**

## Conclusioni

I risultati sperimentali mostrano una non evidente dipendenza stagionale dei valori di concentrazione per i composti carbonilici, così come è stato invece riscontrato nel capitolo precedente relativo agli alifatici-aromatici, determinati nello stesso periodo. Infatti, come si evince dalla Tabella 1 i valori di concentrazione stagionale ottenuti sono tra loro paragonabili, si notano solo moderate fluttuazioni.

Al contrario nell'ambito di ciascun monitoraggio stagionale, nell'arco di tutti e quattro gli anni, si notano invece valori tra loro alquanto differenziati tra la concentrazione minima e massima: formaldeide 1,2-10,3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; acetaldeide 0,7-13,0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; acetone 0,5-5,5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; propionaldeide 0,3-7,7  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; crotonaldeide 0,5-4,7  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; butiraldeide 0,4-4,9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; la benzaldeide 0,1-2,9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; isovaleraldeidee 0,1-1,0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; valeraldeide 0,1-1,5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

L'esperienza maturata precedentemente e dal presente studio, evidenzia che i livelli di concentrazione dei composti carbonilici in ambienti outdoor è inferiore rispetto a quelli riscontrati in ambienti indoor. Per evidenziare la marcata differenza dei valori outdoor e indoor si porta ad esempio il caso della formaldeide, che outdoor generalmente ha valori di concentrazione intorno ai 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , mentre indoor generalmente si riscontrano valori di concentrazione intorno ai 70  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Ciò è imputabile al maggior numero di fonti emissive proprie nell'indoor.

## **COMUNICAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA IN RECENTI CASI DI EMERGENZE IDRO-POTABILI: CRITICITÀ E SPUNTI DI DISCUSSIONE\***

Luca Lucentini, Chiarina Lucia

*Reparto Igiene delle acque interne, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **Gestione del rischio in emergenze idro-potabili e intervento dell'Istituto Superiore di Sanità**

Il Reparto Igiene delle acque interne si occupa della valutazione e gestione dei rischi sanitari associati alle acque superficiali e sotterranee da destinare e destinate al consumo umano e per la sicurezza della filiera idrica (*water safety plans*).

In tale contesto il Reparto è a più riprese coinvolto in fenomeni di emergenze idro-potabili più o meno localmente estese e prolungate nel tempo, contraddistinte dal verificarsi di stati di allerta per la contaminazione delle acque con potenziali ricadute sanitarie.

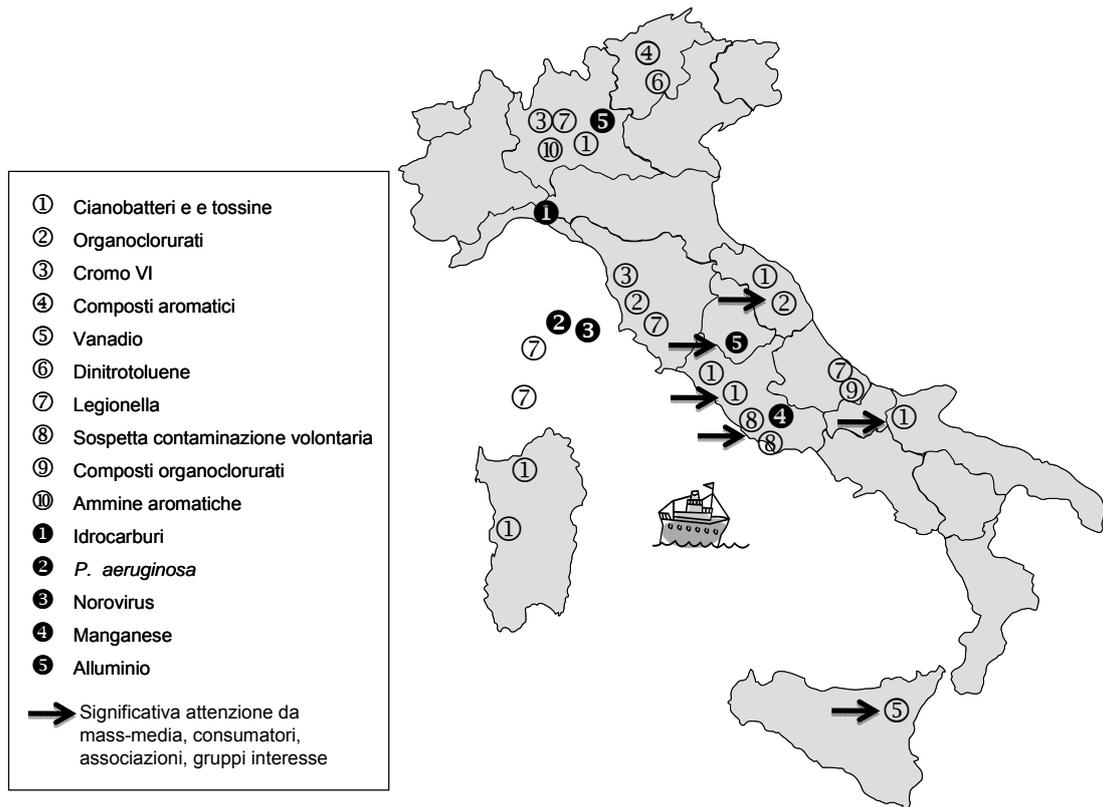
L'esperienza maturata ha dimostrato che, in molti di questi casi, le attività di informazione e comunicazione possono supportare un'efficace gestione delle situazioni di crisi, sia in fase di emergenza che in post-emergenza. In altri casi, tuttavia, l'imprevedibilità e la rapidità dei fenomeni, nell'ambito di un controllo della situazione articolato e complesso, sono alla base di alcune criticità nel processo comunicativo. E l'inadeguatezza di tale processo può essere tale da pregiudicare spesso la corretta percezione di rischio da parte di consumatori con ricadute sulla stessa gestione della crisi da parte dei soggetti istituzionalmente preposti. In generale le difficoltà emergono maggiormente quando la comunicazione non è pianificata e presa in considerazione fin dall'inizio e per tutte le fasi dell'attività, fino alla fase di emergenza.

Questo breve rapporto si focalizza sul processo decisionale e gli attori coinvolti in contesti emergenziali che interessano acque destinate al consumo umano, con particolare attenzione agli elementi risultati determinanti o critici nella informazione e comunicazione dei rischi.

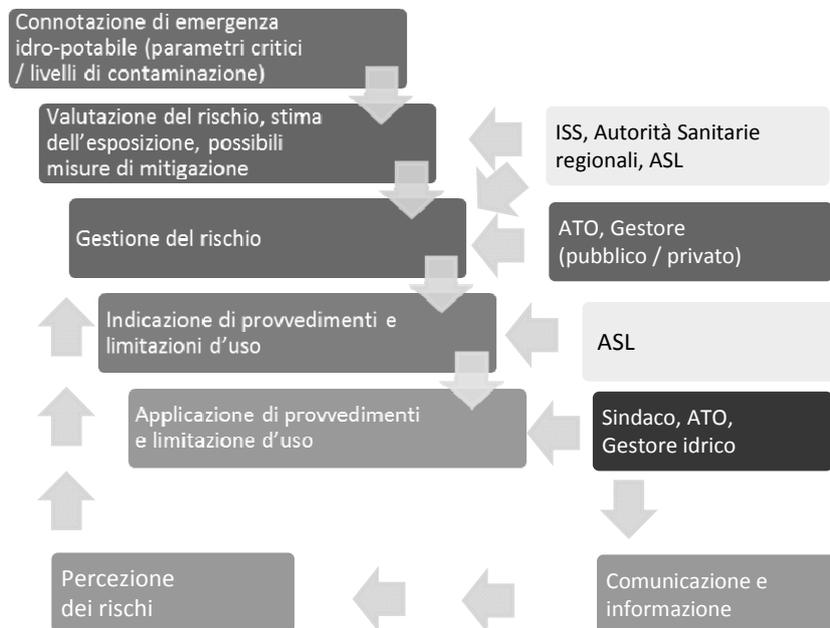
In Figura 1 sono riportate, con riferimento alla localizzazione territoriale e ai fattori di rischio causali, alcune circostanze che negli anni recenti (2007-2010) hanno determinato l'intervento del Reparto, in seguito a richiesta di Autorità politiche, in casi di interrogazioni parlamentari, Autorità giudiziarie, quali magistratura o prefettura, Autorità sanitarie regionali o locali, funzioni pubbliche o amministrative, inclusi commissari straordinari, sindaci, amministratori regionali o provinciali, associazioni interessate alla difesa della salute pubblica o alla tutela ambientale. Alcune di queste circostanze emergenziali hanno ricevuto significativa attenzione da opinione pubblica e mass-media. L'intervento del Reparto, talvolta in collaborazione con altre strutture interne al Dipartimento o afferenti ad altri Dipartimenti o Centri dell'Istituto, è consistito in genere nella consulenza tecnico-scientifica all'ente richiedente, con formulazione di pareri su valutazione e gestione del rischio (Figura 2). Quest'ultima ha generalmente comportato un'analisi dei dati, integrata ove necessario da attività analitiche, valutazioni, indicazioni, raccomandazioni o prescrizioni, consistenti anche in limitazioni d'uso della risorsa idrica.

---

\* Si ringrazia la dr.ssa Barbara De Mei (Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute) per la revisione del testo e gli utili suggerimenti.



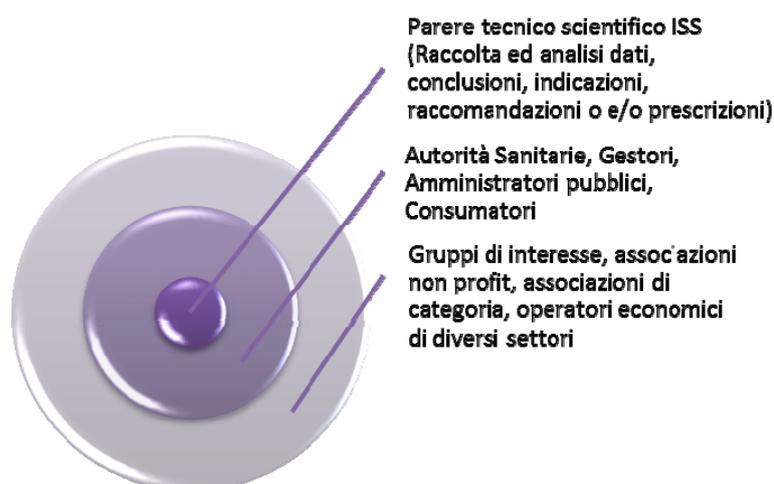
**Figura 1. Alcuni interventi del Reparto Igiene delle acque interne in emergenze idro-potabili – stati di allerta sanitari legati a contaminazioni delle acque da destinare/destinate a consumo umano (non sono comprese le circostanze di deroga) – nell’ultimo triennio (2007-2010)**



**Figura 2. Flusso decisionale in un'emergenza idro-potabile**

Nella gran parte delle circostanze affrontate la ricaduta delle azioni del Reparto riguarda non solo il diretto destinatario della richiesta ma, con minore o maggiore rilevanza, anche altri gruppi di interesse – quali, tra l'altro, associazioni *non profit*, associazioni di categoria, operatori economici di diversi settori – con ruoli essenziali nella comunicazione da e verso i consumatori e da e verso i soggetti preposti alla gestione dell'emergenza.

Il flusso decisionale caratteristico in occasione di un'emergenza idro-potabile, definito sulla base delle indicazioni del DL.vo 31/2001 e, in linea generale, nelle linee guida regionali sull'applicazione del decreto, può essere schematizzato nelle fasi riportate in Figura 3. L'evidenza di rischi a carattere di emergenza, può verificarsi in seguito a riscontro di non conformità dei valori parametrici o alla presenza di contaminanti a livelli di interesse sanitario sia nel corso di regolari monitoraggi che a seguito di segnalazione nel contesto di sorveglianze ambientali in altri ambiti; ad esempio ritrovamento di discariche di agenti chimici in aree che insistono sulla falda o circostanze eccezionali legate ad eventi climatici o a fattori di origine antropica che portano ad un incremento straordinario di sostanza organica in acque superficiali e possono esitare in superamenti di composti sottoprodotti di disinfezione. Si attiva quindi un processo di valutazione del rischio da parte delle Autorità sanitarie competenti per territorio, che può richiedere anche il supporto dell'Istituto, finalizzato a determinare la probabilità del verificarsi a carico dei consumatori, comprese categorie a rischio, di effetti avversi correlati al consumo delle acque contaminate per certi parametri e livelli definiti.



**Figura 3. Destinatari dell'informazione emessa con parere dell'ISS in merito alla gestione del rischio in circostanze emergenziali sulle acque destinate a consumo umano**

Gli stessi soggetti pubblici, con coinvolgimento dei sistemi di gestione idrica e delle Autorità di Ambito Ottimale (ATO), intervengono nella fase successiva di gestione del rischio, nella quale, alla luce dei risultati della stima dei rischi, si definiscono le strategie di controllo, considerando il possibile impatto sanitario legato all'esposizione umana al/ai fattore/i di rischio evidenziato/i, le misure per la sua eliminazione o mitigazione, anche sulla base delle risorse disponibili. Giova ricordare, in tal senso, che l'art. 10 del DL.vo 31/2001 in merito all'adozione di provvedimenti e limitazioni d'uso, affida all'Autorità sanitaria locale la decisione, evidenziando che nella valutazione devono essere attentamente considerati "i rischi che potrebbero derivare da un'interruzione dell'approvvigionamento o da una limitazione di uso

delle acque erogate”. Ai sensi della normativa vigente, sulla base delle proposte e indicazioni formulate dall’Autorità sanitaria spetta al sindaco l’implementazione delle eventuali misure di interruzione della fornitura idrica o l’adozione di limitazioni d’uso, compresa la comunicazione alla popolazione.

## **Esperienze di comunicazione durante emergenze idro-potabili**

In questo processo, possiamo dire in tutti gli stadi, l’informazione e la comunicazione dei rischi oggettivi è effettuata, non sempre con adeguato coordinamento, dai diversi soggetti coinvolti nella crisi con differenti ruoli: particolarmente coinvolte sono Autorità sanitarie a livello locale, regionale e centrale, autorità amministrative, gestori del servizio idrico, associazioni di categorie e semplici cittadini; in molti casi viene anche richiesto l’intervento di attori esterni chiamati ad esprimere valutazione sui rischi e sulla gestione della crisi, quali ad esempio esperti del mondo universitario.

La definizione comune di “comunicazione del rischio” (1) vede il processo comunicativo come uno “scambio interattivo” di informazioni e opinioni fra individui, istituzioni e gruppi di interesse, che quindi non si ferma alla sola informazione tecnico-scientifica sulla natura del rischio, ma considera anche le implicazioni non direttamente connesse al rischio ma piuttosto a fattori emotivi legati alle reazioni degli interlocutori. Gli esperti indicano che una comunicazione che coniughi gli argomenti razionali con la considerazione degli aspetti che determinano la “percezione” del rischio”, che sia adeguatamente preparata e anche supportata da moderne tecnologie (2), è la chiave per conseguire una vasta condivisione della valutazione del problema e delle azioni intraprese per la sua gestione. E, più in generale, per instaurare un importante rapporto di fiducia e dialogo fra gli attori che il rischio devono gestirlo e quelli che vi sono esposti.

Nel settore delle acque destinate a consumo umano è possibile individuare alcuni punti critici nell’informazione e comunicazione del rischio che tendono ad accentuarsi nelle situazioni di crisi.

Il primo aspetto da evidenziare nell’ambito di molti fenomeni di contaminazione delle acque è comune ad altre problematiche ambientali con rilevanza sulla salute come l’inquinamento atmosferico o dei suoli; esso riguarda l’esistenza di dati e informazioni incomplete o non armonizzate, derivanti da attività concomitanti da parte di diversi enti, a fini di ricerca, controlli interni, controlli ufficiali o prodotti da gruppi di interesse. Il tema attiene in molti casi alla comunicazione “interna” alle istituzioni, per migliorare la quale deve essere anzitutto incrementata la sensibilità degli operatori istituzionali a migliorare le sinergie e agire in costante confronto e comunanza di intenti, seppure nella specificità dei campi di azione. Nell’affrontare situazioni in cui sussistono informazioni e dati contraddittori, è opportuno, prima di intervenire a livello decisionale, selezionare le informazioni sulla base del loro livello

di qualità e validazione, e, laddove possibile, unire e integrare i dati interpretando le incongruenze.

Un elemento confondente nel processo decisionale con effetti importanti sulla comunicazione, talora anche tra addetti ai lavori, riguarda anche i punti di rispetto della conformità; si verifica, infatti, in alcuni casi, l’applicazione di limiti stabiliti per acque destinate al consumo umano e pertanto da riferire al “punto di consegna” (in generale rubinetto di utenza ai sensi dell’art. 6 del DL.vo 31/2001) ad acque da destinare al consumo superficiali o profonde, per le quali esistono differenti normative e spesso diversi valori limite, generati da processi di

valutazione del rischio di differente natura (ad esempio finalizzate a valutare gli effetti sulla salute o sull'ambiente).

Esistono poi significativi ostacoli da parte della popolazione potenzialmente esposta a considerare con obiettività il significato dei valori di parametro o i valori guida per parametri non normati e dei criteri notevolmente conservativi che presiedono alla loro definizione. In alcuni casi, infatti, le persone hanno difficoltà a comprendere e condividere una valutazione scientifica seguendo il punto di vista degli esperti, ma osservano i loro criteri e valori anche nella determinazione dei comportamenti.

La direttiva 98/83/CE, recepita in Italia con il citato DL.vo. 31/2001, finalizzata a tutelare la salute umana da rischi chimici e microbiologici correlati al consumo delle acque, ha stabilito "valori parametrici" specifici per diversi fattori di rischio, adeguati a garantire che le acque possano essere consumate in condizioni di sicurezza nell'intero arco della vita. I valori sono principalmente basati sugli orientamenti e "valori guida" stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per la qualità dell'acqua potabile adottando, in taluni casi, criteri anche più conservativi. I valori guida rappresentano la concentrazione massima di un contaminante tale da assicurare un consumo sicuro dell'acqua nell'intero arco di una vita, tenendo conto anche delle fasce di popolazione più vulnerabili.

Secondo quanto indicato dalla stessa OMS, il superamento di un valore guida può non comportare un rischio significativo o un aumento di rischio per la salute umana e deviazioni dei valori al di sopra di valori guida, sia nel breve che nel lungo periodo, non indicano necessariamente la non idoneità dell'acqua al consumo. L'entità del superamento e il periodo per il quale il valore guida può essere superato senza effetti sulla salute pubblica deve essere valutata a seconda della specifica sostanza.

Sebbene questo approccio sia convenzionalmente accettato dalla comunità scientifica e sia pienamente trasposto sul piano normativo europeo e nazionale, perplessità, scetticismi o anche nette opposizioni si verificano spesso nell'ambito della gestione del rischio su superamenti occasionali o ricorrenti di valori parametrici. Processo che, come visto, una volta valutato l'oggettivo rischio sanitario correlato alla non conformità, deve considerare dal punto di vista tecnico-scientifico tutte le possibili alternative per attenuare il rischio e, in mancanza di tali misure, confrontare le diverse opzioni sulla distribuzione con i rischi connessi alle limitazioni d'uso delle acque in distribuzione (cfr. il citato art. 10 del DL.vo 31/01). Nondimeno, una reazione ricorrente di fronte a una decisione di distribuzione controllata delle acque in presenza di superamenti di valori soglia – seppure presieduta da una rigorosa valutazione improntata alla massima protezione della salute – porta a interpretare la misura come una mera imposizione normativa, sintetizzabile nel diffuso slogan "hanno reso l'acqua potabile per legge".

Tale circostanza, diffusa non solo nel settore delle acque e attentamente investigata dagli esperti di discipline afferenti alla comunicazione del rischio, si verifica nei casi in cui più che valutazioni tecnico-scientifiche (anche se sufficientemente ed efficacemente illustrate) sono i fattori emotivi a determinare la percezione del rischio. Abbiamo verificato in molti casi come paura e rischio siano entità che possono muoversi in direzioni anche opposte. In effetti la percezione del rischio è riconosciuta come risultante di elementi principalmente emotivi che fanno spesso sì che di fronte ad un rischio la gente, più che comprendere e valutare aspetti tecnici (e statistiche sul confronto dei rischi) si affida alle capacità dei gestori del rischio "Non è la conoscenza delle leggi dell'aerodinamica che fa superare la paura di volare, ma l'abitudine e la fiducia nel pilota e nella compagnia aerea" (3).

Decodificare - anche per gestire - i meccanismi che determinano la percezione del rischio è una ricerca che ha appassionato molti esperti. Fondamentale in tale contesto la relazione coniata da Peter M. Sandman (4):

$$Risk = Hazard + Outrage$$

Nella quale a determinare il rischio percepito sono due componenti con pari dignità: il pericolo vero e proprio, cioè la causa di danno come malattia o morte (*hazard*) – riconducibile al rischio oggettivamente valutato dagli “addetti ai lavori” – e una serie di componenti determinanti per il pubblico ma quasi sconosciuti ai tecnici, assimilati nell’”offesa” percepita (*outrage*). La relazione spiega brillantemente perché rischi di proporzioni analoghe siano considerati e “quantificati” in misura assai diversa da un individuo-consumatore (5-7).

Agendo su componenti emotive non è poi escluso che meccanismi esterni più o meno motivati da ragioni di mercato o ideologiche possano intervenire cercando di manipolare la percezione del rischio e quindi i comportamenti dei consumatori, così come che il settore dell’informazione possa, in qualche caso, fornire un quadro delle conoscenze e un’impostazione del problema che abbia un effetto di alimentare le componenti emotive. In ogni caso è compito dell’autorità provvedere tanto ad una adeguata gestione dei rischi quanto ad una adeguata, obiettiva ed efficace comunicazione per la quale è necessaria la consapevolezza della esistenza e natura del grado di offesa, in modo da poterlo efficacemente, nei limiti del possibile, fronteggiare.

Se guardiamo ad alcune risultanze degli studi sulle “determinanti” dell’offesa (1), cioè sui fattori che presiedono alle componenti emotive della percezione del rischio possiamo avere una luce nel comprendere come il riscontro (da parte, è da sottolineare, delle stesse autorità sanitarie) di un certo parametro, per fare un esempio attuale una microcistina<sup>1</sup> nelle acque destinate al consumo umano, anche notevolmente al di sotto del valore guida (valutato peraltro per effetti cronici e ancor più protettivo per esposizioni occasionali) possa generare una reazione spropositata nell’amplificare il rischio percepito rispetto al rischio oggettivamente misurabile, quest’ultimo, al livello attuale delle conoscenze, prossimo al rischio zero (Tabella 1).

**Tabella 1. Alcune determinanti dell’offesa in un’emergenza idro-potabile causata da presenza di tracce di microcistina nelle acque (è evidenziata in grassetto la fattispecie applicabile)**

Meno rischioso	Più rischioso
Volontario	<b>Involontario</b>
<b>Familiare</b>	Non familiare
Controllabile	<b>Incontrollabile</b>
Controllabile dall’individuo	<b>Controllabile da altri</b>
Equo	<b>Ingiusto</b>
Non memorabile	<b>Indimenticabile</b>
Non temuto	<b>Temibile</b>
<b>Cronico</b>	Acuto
Diffuso nel tempo e nello spazio	<b>Concentrato nel tempo e nello spazio</b>
Non fatale	<b>Fatale</b>
Immediato	<b>Ritardato</b>
<b>Naturale</b>	Artificiale
Possibile una attenuazione da parte dell’individuo	<b>Impossibile una attenuazione da parte dell’individuo</b>
Individuabile	<b>Non individuabile</b>
Moralmente irrilevante	<b>Moralmente rilevante</b>

<sup>1</sup> Le microcistine costituiscono una classe di tossine di cui sono note più di ottanta varianti strutturali, responsabili di fenomeni di avvelenamento sia acuto che cronico negli animali e nell’uomo; le tossine sono prodotte da alcune specie di alghe verde-azzurre o cianobatteri che possono proliferare, in fenomeni di *bloom*, in corpi idrici superficiali destinati alla produzione di acque per il consumo umano.

## Conclusioni

Esperienze di comunicazione nel corso di emergenze idro-potabili, ad esempio nella recente circostanza delle “Deroghe”<sup>2</sup>, condivise con i colleghi del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria che hanno riportato esperienze analoghe riferite ad altri settori (ad esempio il rischio elettromagnetico da elettrodotti o la presenza di una discarica o un termovalorizzatore in un certo territorio), dimostrano la necessità da parte degli esperti nella gestione dei rischi sanitari legati a problematiche ambientali di approfondire la conoscenza dei meccanismi di comunicazione anche attraverso periodici scambi di esperienze, di realizzare una comunicazione continua e non solo in casi di emergenza e, soprattutto, di integrare la *task-force* nell'emergenza con esperti in comunicazione.

È stato anche evidenziato come sia necessario, non solo in fase emergenziale ma anche su base di *routine*, approfondire l'ascolto per cercare di comprendere l'origine di una percezione “immotivata”. Comunicare a questo livello, con la comprensione di paure più o meno “legittime”, significa, infatti, generare un rapporto di fiducia, unica modalità per affrontare i problemi in maniera condivisa. Importante è stato anche in molti casi il coinvolgimento della controparte, adeguatamente informata, nella ricerca di una soluzione comune; si è notato, in questi casi, che la disposizione della gente ad accettare il rischio è notevolmente maggiore quando viene percepito che si è sulla strada giusta per mantenerlo sotto controllo e possibilmente eliminarlo progressivamente.

## Bibliografia

1. Committee on Risk Perception and Communication, National Research Council. *Improving Risk Communication*. Washington, DC: National Academy Press; 1989.
2. Corbo M, Savelli D, De Mei B, Comba P. Approccio multimediale alla comunicazione del rischio: lo studio di Longarina. In: Appelgren E, Ruggeri P, Spila Alegiani S (Ed.). *Epidemiologia per la sorveglianza: dal disegno alla comunicazione*. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 15-16 maggio 2006. *Riassunti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (ISTISAN Congressi 06/C2). p. 72.
3. Norsa L. La comunicazione del rischio: comprendere le percezioni. *Crisis Communication* 2000;2:1-7. Disponibile all'indirizzo: [http://www.luiginorsa.com/docs/n\\_0at017.pdf](http://www.luiginorsa.com/docs/n_0at017.pdf); ultima consultazione 20 marzo 2011.
4. Sandman PM. Risk = hazard + outrage: coping with controversy about utility risks. *Engineering News-Record*, 1999;4:A19-A23.

---

<sup>2</sup> Lo strumento della deroga è previsto espressamente dalla direttiva 98/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano e dal suo recepimento nazionale D.Lgs. 31/2001 e *s.m.i.* Gli Stati membri possono stabilire deroghe per parametri chimici purché la deroga non presenti un rischio per la salute umana, l'approvvigionamento delle acque potabili nella zona interessata non possa essere mantenuto con nessun altro mezzo congruo, la deroga abbia durata più breve possibile e sia concessa dallo Stato al massimo per due successivi trienni; è tuttavia prevista la possibilità di rinnovare la deroga per un ulteriore periodo non superiore a tre anni, previa approvazione da parte della Commissione Europea. Negli intendimenti del legislatore europeo lo strumento della deroga consente di gestire una situazione di superamento sistematico di valori per determinati parametri – correlabile per lo più a presenza nelle acque di elementi minerali di origine geologica – con il miglior compromesso in termine di rischi-benefici, tenendo in particolare conto dei rischi correlati alla limitazione d'uso o sospensione della distribuzione idrica; nel contempo, la concessione della deroga è subordinata alla prescrizione e implementazione delle misure necessarie ed efficaci a ripristinare la qualità dell'acqua nel tempo, in un regime di costante sorveglianza.

5. Slovic P, Fischhoff B, Lichtenstein S. Rating the risks. *Environment* 1979; 21:3:4-20,36-39.
6. Sjoberg, L. Risk Perception by the public and by experts: a dilemma in risk management. *Human Ecology Review* 1999;6(2):1-9.
7. Sandman PM. *Responding to community outrage: strategies for effective risk communication*. Fairfax (VA): American Industrial Hygiene Association; 1993.

# DIATOMEI COME INDICATORI DEGLI ECOSISTEMI ACQUATICI DI TRANSIZIONE

Camilla Puccinelli

*Reparto Qualità ambientale e ittiocoltura, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

L'analisi delle comunità biologiche delle acque superficiali rappresenta uno degli elementi obbligatori della Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60 (*Water Frame Directive*; WFD) (Comunità Europea, 2000). La Direttiva europea è infatti incentrata sugli elementi biologici presenti nei differenti livelli trofici dell'ecosistema: i produttori primari (alghe e macrofite) e i diversi livelli di consumatori (macroinvertebrati e pesci) a supporto dei quali sono riportati gli elementi chimico-fisici e idromorfologici.

Le Diatomee rappresentano uno dei gruppi di organismi utilizzati dalla WFD per l'identificazione dei gradienti di qualità ecologica delle acque superficiali. Esse sono diffuse ampiamente diffuse e rappresentano una delle principali componenti del fitobenthos che si sviluppano nei corpi d'acqua e del fitoplancton marino. Hanno caratteristiche biologiche ed ecologiche che le rendono buoni indicatori biologici di qualità delle acque e il loro uso è diffuso e ben sviluppato specialmente per la valutazione della qualità delle acque correnti (Prygiel *et al.*, 1999). La biodiversità delle Diatomee costituisce un valido strumento per il monitoraggio della qualità generale delle acque e per la valutazione dello stato trofico o fenomeni più specifici come l'acidificazione (Prygel & Coste, 1995).

L'implementazione della Direttiva richiede quindi una estensione delle conoscenze sulla ecologia e la distribuzione delle specie di Diatomee al fine di fornire utili per l'identificazione delle comunità di riferimento per ogni tipo di corpo d'acqua, incluse le acque di transizione, zone umide, che rappresentano un elemento ecologicamente e funzionalmente significativo dell'ambiente acquatico (Comunità Europea, 2003). Infatti, sebbene le Diatomee di acqua dolce siano regolarmente usate come indicatori, molto poco è conosciuto riguardo l'autoecologia e le preferenze specie – specifiche per la salinità e i nutrienti di quelle che si sviluppano nelle acque di transizione.

Gli ecosistemi di transizione possono essere definiti come “paludi, acquitrini, torbiere, bacini naturali o artificiali con acqua stagnante o corrente, salmastra” (IUCN, 1971).

Si formano nelle zone costiere, in particolare nei tratti terminali dei fiumi, che trasportano l'acqua proveniente dal drenaggio continentale, dove le acque dolci si incontrano con le acque marine (Tomasino, 1995).

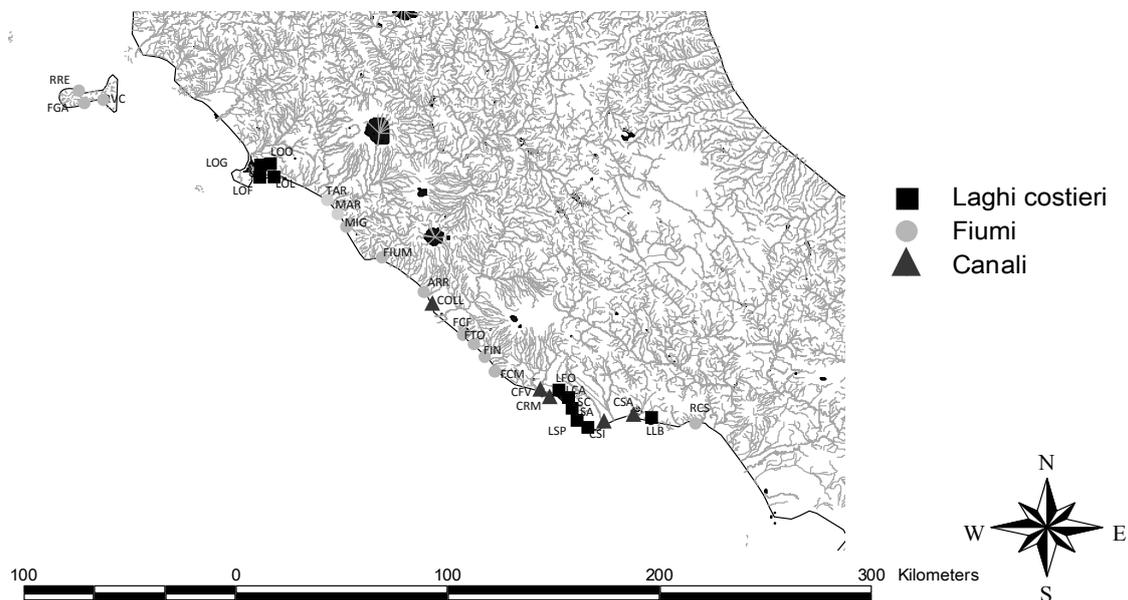
Dall'emanazione della Direttiva 2000/60/CE, le acque di transizione, ecosistemi trascurati e sottovalutati fino a poco prima, sono diventati oggetto di interesse da parte della comunità scientifica e istituzionale, essendo identificate come uno dei corpi idrici da tutelare e salvaguardare (Art. 1, Direttiva 2000/60/CE). Le acque di transizione sono definite: come “corpi idrici superficiali in prossimità della foce di un fiume, che sono parzialmente di natura salina a causa della loro vicinanza alle acque costiere, ma sostanzialmente influenzati dai flussi di acqua dolce” (Art. 2, Direttiva 2000/60/CE).

In questa definizione, vengono dunque compresi tutti gli ambienti di acque salmastra: l'elevata eterogeneità di questi ambienti ha sempre costituito un problema per una loro individuazione univoca e per gli interventi di tutela e salvaguardia (McLusky & Elliott, 2007;

Ferreira *et al.*, 2006; Tagliapietra *et al.*, 2006; Bricker, 2003). Nell'area geografica mediterranea questi ecosistemi sono stati distinti in acque correnti di transizione come gli estuari, e acque lentiche di transizione come laghi costieri e lagune (Basset *et al.*, 2006). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze degli ecosistemi acquatici di transizione attraverso lo studio delle specie diatomiche e valutare la loro potenzialità come descrittore ed indicatrice di tali ambienti.

## Area di studio

Sono stati studiati 28 siti rappresentativi delle tipologie di acque di transizione presenti lungo la costa tirrenica di Lazio e Toscana (Figura 1). Sono stati individuati ecosistemi lotici di transizione come le foci di fiumi e di canali ed ecosistemi lentici di transizione come i laghi costieri.



**Figura 1. Area di studio e localizzazione delle stazioni di campionamento**

Le foci fluviali caratterizzano il reticolo idrografico laziale; 10 estuari sono stati campionati a partire dal Rio Santa Croce in Provincia di Latina, al confine con la Campania fino al Torrente Arrone, in provincia di Viterbo. I rimanenti 3 ecosistemi lotici di transizione sono situati all'Isola d'Elba (Tabella 1).

Le foci dei canali artificiali oggetto di questo studio sono state cinque: 4 canali (il Canale Torre S. Anastasia, il Canale Sisto, il Rio Martino e il Canale Foce Verde nella Provincia di Latina) che sono stati creati in seguito alle opere di bonifica idraulica; e l'ultimo sito è il Collettore delle Acque Alte situato nel Comune di Fiumicino (Tabella 2).

La terza tipologia di acque di transizione presa in esame sono i laghi costieri. Sono stati selezionati 10 siti (Tabella 3) nei seguenti laghi costieri il Lago Lungo, i Laghi pontini di Sabaudia (3 stazioni), Fogliano e Caprolace e la Laguna di Orbetello (4 stazioni).

**Tabella 1. Foci fluviali oggetto di studio**

<b>Codice</b>	<b>Nome</b>
RSC	Rio Santa Croce
FCM	Fosso del Cavallo Morto
FIN	Fosso dell'Incastro
FTO	Fosso di Pratica di Mare
FCF	Fosso del Pantanello
ARR	Fiume Arrone
FIU	Rio Fiume
MIG	Fiume Mignone
MAR	Fiume Marta
TAR	Torrente Arrone
RVC	Rio Val dei Carpisi
RRE	Rio Redinoce
FGA	Fiume Galeo

**Tabella 2. Foci dei canali artificiali oggetto di studio**

<b>Codice</b>	<b>Nome</b>
CSA	Canale Torre S. Anastasia
CSI	Fiume Sisto
CRM	Canale Rio Martino
CFV	Canale Foce Verde
COL	Collettore Acque Alte

**Tabella 3. Laghi costieri oggetto di studio**

<b>Codice</b>	<b>Nome</b>
LLB	Lago Lungo
LSP	Lago di Sabaudia
LSA	Lago di Sabaudia
LSC	Lago di Sabaudia
LCA	Lago di Caprolace
LFO	Lago Fogliano
LOL	Laguna di Orbetello
LOF	Laguna di Orbetello
LOO	Laguna di Orbetello
LOG	Laguna di Orbetello

## **Materiali e metodi**

### **Analisi delle comunità diatomiche**

Il campionamento, il trattamento dei campioni e tutte le altre fasi del lavoro di laboratorio sono stati condotti in accordo alle vigenti norme europee (EN 13946, 2002; EN 14407, 2004). Le Diatomee epilittiche sono state campionate grattando con uno spazzolino a setole rigide substrati litici naturali, quali pietre e ciottoli, o artificiali duri, come pali di ponti e paratie di cemento. La raccolta delle diatomee epifittiche è stata effettuata invece grattando la superficie sommersa dei fusti delle macrofite emergenti costituenti il canneto, e spremendo e/o agitando in

un baecker parti di macrofite sommerse. Infine le forme epipeliche presenti sulla superficie litorale sono state campionate tramite una pipetta pasteur.

Al fine di osservare i frustuli delle Diatomee per l'identificazione, i campioni sono stati trattati usando perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%) per eliminare la sostanza organica e acido cloridrico (HCl al 37%) per dissolvere i carbonati o utilizzando di HNO<sub>3</sub> al 65% e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96%). Successivamente sono stati montati su vetrini con una resina ad elevato indice di rifrazione e in ogni campione sono state contate e identificate almeno 400 valve utilizzando un microscopio ottico (Nikon Optiphot-2) a 1000 ingrandimenti ad immersione.

Per l'identificazione fino a livello di specie, e quando possibile di varietà, è stato utilizzato un sistema di analisi delle immagini, costituito da una camera per microfotografia connessa al microscopio e ad un computer, e da un software, utilizzato per digitalizzare e analizzare le immagini dei frustuli delle diatomee. Le alghe sono state riconosciute al livello di specie utilizzando manuali di riconoscimento e articoli scientifici (Krammer & Lange-Bertalot, 1986; 1988; 1991a; 1991b; Round *et al.*, 1990; Van Dam *et al.*, 1994; Lange-Bertalot 2000; 2001; 2002; 2003; Witkowski *et al.*, 2000, Danielidis *et al.*, 2003).

## Parametri ambientali a supporto

Parametri fisico-chimici come temperatura dell'acqua, conducibilità elettrica, pH e sono stati rilevati sul campo attraverso l'utilizzo di sonde portatili.

Sui campioni d'acqua, raccolti in bottiglie di vetro da un litro e conservate prima in frigoriferi portatili e successivamente a +4° C circa, sono state svolte analisi chimiche con l'ausilio di kit commerciali e di uno spettrofotometro. Le analisi hanno compreso la determinazione delle concentrazioni di: nitrati, ortofosfati, cloruri, ione ammonio, domanda chimica di ossigeno e domanda biologica di ossigeno.

## Analisi dei dati

La struttura delle comunità diatomica è stata analizzata attraverso metodi di Classificazione, o *Cluster Analysis*. Tale analisi multivariata permette di individuare, all'interno di un set di variabili, gruppi caratterizzati da una maggior omogeneità ed è stata eseguita attraverso la matrice di distanza di Bray e Curtis (Bray & Curtis, 1957). I dati ottenuti dalle analisi delle variabili ambientali e dai parametri chimici e chimico-fisici, e i dati ottenuti dall'identificazione delle comunità diatomiche sono stati trattati con l'analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis*, PCA). Per indagare sulla correlazione tra fattori abiotici e comunità diatomiche, le componenti principali ottenute dalle due PCA sono state analizzate attraverso l'Analisi della Correlazione Canonica.

Sono stati utilizzati i Software SASS 1.60 e PAST 2.05.

## Risultati

Le tipologie di acque di transizione prese in considerazione sono tre: fiumi, canali artificiali e laghi costieri. Le foci naturali del Lazio sono guadabili con una profondità massima di 70 cm (fiume Arrone), sfociano in arenili sabbiosi che caratterizzano la granulometria del sedimento, ad eccezione del Fosso del Fiumicello che, sfocia in una spiaggia composta da massi e ciottoli e presenta un substrato limoso. I siti, Rio Santa Croce, Fosso del Cavallo Morto, Fiume Incastro,

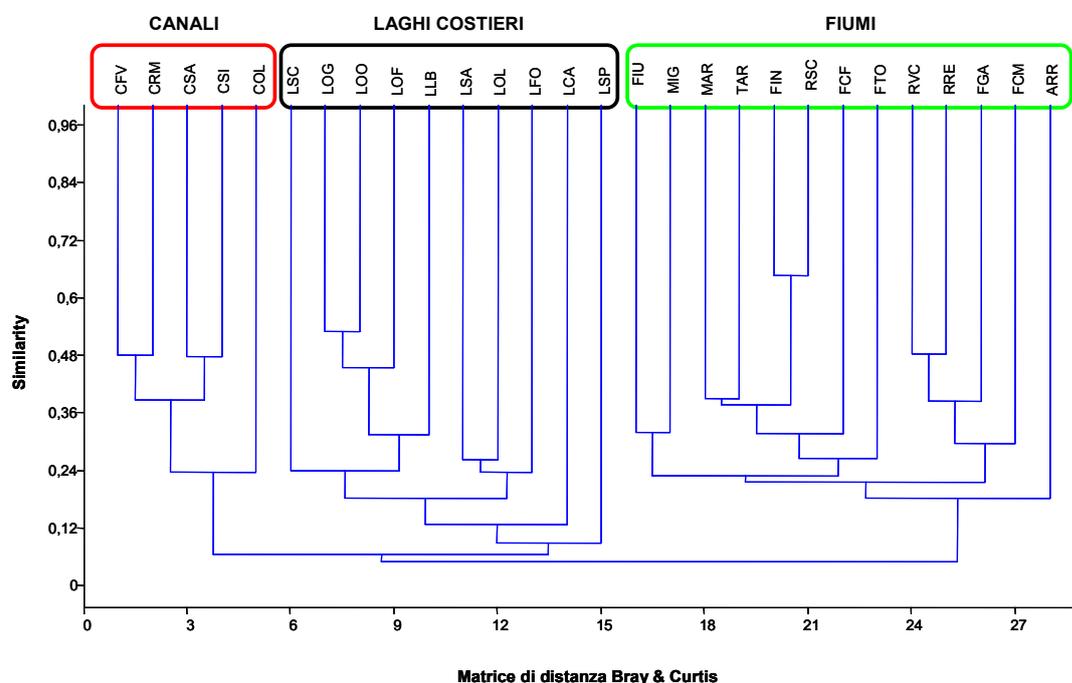
sono caratterizzati dalla presenza di vegetazione riparia. Totale assenza di copertura macrofitica si riscontra nelle foci del Mignone, del Marta e del Torrente Arrone.

I canali artificiali presi in considerazione, Sant’Anastasia, Fiume Sisto, Canale delle Acque Alte e Canale Rio Martino non sono guadabili, presentano strutture portuali alle loro foci, con argini cementificati. Il Collettore delle Acque Alte, che nel suo tratto terminale è guadabile e naturale, è caratterizzato da un substrato limoso, sabbioso, privo di vegetazione riparia.

Le rive dei laghi costieri, Lago Lungo, Lago di Caprolace, la stazione sul Canale Catrattina del Lago di Sabaudia e la stazione sul Tombolo della Feniglia presentano un substrato limoso. Nelle stazioni rimanenti del Lago di Sabaudia, del Lago di Fogliano e della Laguna di Orbetello non è stato possibile l’accesso in acqua.

Sono state identificate un totale di 219 tra specie e varietà diatomiche; gli ecosistemi di transizione che presentano un maggior numero di specie 144, sono stati i fiumi, 74 specie sono state individuate nei canali e 76 nei laghi costieri.

I dati ottenuti dall’analisi delle comunità studiate sono stati classificati attraverso la *Cluster analysis* (Figura 2).



**Figura 2. Cluster analysis effettuata sulla struttura delle comunità diatomiche utilizzando la matrice di similarità di Bray e Curtis**

I dati dallo studio delle comunità diatomiche e dei parametri ambientali sono stati ordinati attraverso la PCA (Figure 3-4).

I dati delle componenti principali ottenute nelle PCA di fattori abiotici e comunità biologiche sono stati analizzati utilizzando l’Analisi Canonica delle Corrispondenze. Da tale analisi è stato possibile individuare i principali fattori abiotici (rappresentati dalla componente Pcc1) che influenzano le comunità diatomiche (rappresentate dalle componente Pcb1, Pcb4). In Tabella 4 vengono riportati i coefficienti di correlazione (Rho di Pearson) tra le principali componenti chimiche (Pcc) e quelle biologiche (Pcb).





Le specie correlate maggiormente con pcb1 sono *Fragilaria capucina* Desmazieres var. *capucina*, *Fragilaria biceps* Lange-Bertalot, *Surirella brebissonii* Krammer & Lange-Bertalot.

Quelle maggiormente correlate con pcb4 troviamo *Achnanthes brevipes* Agardh, *Amphora coffeaeformis* Agardh, *Navicula cryptotenella* Lange-Bertalot, *Navicula recens* Lange-Bertalot.

## Discussione

Sono state riconosciute più di 11.000 valve di diatomee, e identificate 219 tra specie e varietà, sia di acqua dolce che marina. Le conoscenze sull'ecologia di queste specie, si riferiscono principalmente a studi svolti sulle comunità di acqua dolce, in particolare dei corsi d'acqua.

Le specie di acqua dolce maggiormente ricorrenti in tutte le tre tipologie studiate, sono state: *Cocconeis placentula* Ehrenberg, *Nitzschia frustulum* Grunow, *Synedra fasciculata* Grunow. Studi effettuati sulla ecoregione mediterranea riportano la presenza di queste specie anche in ambienti salmastri (Trobajo, 2004; Miho & Witkowski, 2005; Fanuko & Valic, 2009). Sono state identificate in tutte e tre le tipologie studiate specie in grado di tollerare ampie variazioni di concentrazione di cloruri. In particolare: *Gomphonema parvulum* Kutzing, specie oligoalobica, che ha uno sviluppo ottimale a concentrazioni di cloruri compresi tra 50-200 mg/L è stata ritrovata nei fiumi, laghi costieri e canali; *Bacillaria paxillifera* Muller e *Craticula halophila*, specie βmeso-alobie, che hanno uno sviluppo ottimale a concentrazioni superiore a 500 mg/L, sono state ritrovate solo nei fiumi e nei canali, come anche *Cyclotella meneghiniana* Kutzing specie alofila, con un intervallo di tolleranza compreso tra 200 e 500 mg/L (Van Dam *et al.*, 1994; Dell'Uomo, 2004). Nei fiumi e nei canali sono risultate molto diffuse *Navicula veneta* Kutzing, *Navicula recens* Lange-Bertalot, *Luticola nivalis* Mann, *Eolimna minima* Lange-Bertalot, *Nitzschia amphibia* Grunow, specie caratteristiche di ambienti eutrofici. Un'unica specie *Achnantheidium minutissimum* Czarnecki, considerata poco tollerante all'inquinamento, è stata identificata nei fiumi oggetto di studio (Van dam *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1995; Prygiel & Coste, 1999; Dell'Uomo, 2004).

L'assenza di specie che si sviluppa in ambienti reici, è quindi da attribuire alle caratteristiche naturali di questi ecosistemi e non dovuta a cause di origine antropica.

Le specie marine maggiormente identificate presenti nelle tre tipologie di acque di transizione studiate sono state *Amphora strigosa* Hustedt, *Brachysira aponina* Kutzing, *Delphineis surirella* Andrews. Nei canali e nei laghi costieri sono diffuse *Diploneis bombus* Ehrenberg e *Grammatophora marina* Kutzing. I laghi costieri sono caratterizzati dalla presenza di specie come *Cocconeis scutellum* Ehrenberg, *Lyrella Lira* Karayeva, *Navicula duerrenbergiana* Hustedt.

Hanno trovato in questa tipologia il loro habitat ottimale specie, appartenenti al genere *Seminavis*, identificato per la prima volta da Mann nel 1990 (Mann, 1990), per le quali non esiste ancora una conoscenza approfondita a livello di specie. Due autori hanno determinato due specie rispettivamente *Seminavis robusta* e *Seminavis barbara* (Witkowski *et al.*, 2000; Danielidis *et al.*, 2003).

In questo lavoro sono state ritrovate *Seminavis barbara* Witkowski e altre di specie non nota riportata in appendice come *Seminavis* sp.

La maggior parte di specie ritrovate sono classificate come tolleranti alle variazioni dei parametri ambientali: la scarsa velocità di corrente, l'elevato tasso di produttività primaria ed elevate concentrazioni di cloruri consentono lo sviluppo di organismi ad ampia valenza ecologica capaci di adattarsi a condizioni ambientali di transizione.

Nella *Cluster Analysis* effettuata con i dati delle abbondanze delle specie ritrovate (vedi Figura 2), si osserva una prima significativa divisione in funzione della salinità ovvero laghi costieri e canali con maggiore salinità da un lato, e fiumi oligoalini dall'altro. Un'ulteriore suddivisione si osserva all'interno dello stesso gruppo tra laghi costieri e canali. Uno dei principali motivi risiede nella diversa concentrazione di nutrienti nelle due tipologie in particolare, basse concentrazioni di nitrati e fosfati nei laghi costieri ed elevate nei canali; e alle caratteristiche idromorfologiche, lentiche nei primi e lotiche nei secondi. Dall'analisi delle componenti principali, si evidenziano raggruppamenti simili.

L'ordinamento ottenuto dalla PCA dei parametri ambientali, consente di distinguere le tre tipologie di acque di transizione investigate (vedi Figura 4). Tale distribuzione avviene sul primo asse che risulta correlato positivamente secondo un gradiente di salinità e negativamente con nitrati, e lungo il secondo asse seguendo un gradiente positivo di fosfati.

Tali risultati sono in accordo con quanto riportato in altri studi in merito alla distribuzione delle comunità lungo un gradiente di salinità e concentrazione di nutrienti (Admiraal & Peletier, 1980; Underwood *et al.*, 1998; Haubois *et al.*, 2005; Zalat & Vildary, 2005; Della Bella *et al.*, 2007; Puccinelli, 2007; Fanuko & Valic, 2009; Rovira *et al.*, 2009). Per questo gradiente è stato possibile creare un modello lineare, che consente di stimare i valori della componente chimica da quella biologica (Figura 5).

## Conclusioni

I risultati hanno mostrato una stretta correlazione delle comunità diatomiche ai diversi fattori abiotici. Le diatomee hanno descritto l'estrema variabilità dei parametri ambientali che caratterizzano le foci fluviali in modo ottimale, rilevando per molti di questi situazioni compromesse. Per quanto riguarda i canali, che presentano sponde e alvei cementificati, le specie diatomiche sono risultate essere un valido strumento di descrizione della qualità della matrice acquosa. Non si è ottenuto lo stesso risultato negli ecosistemi lagunari, probabilmente attribuibile al minor numero di specie rinvenute nei siti studiati e alle scarse conoscenze sull'ecologia delle specie marine, che compongono queste comunità.

Questi risultati devono essere confrontati, a scala mediterranea, per valutare le migliori metodologie disponibili che renderebbero le comunità diatomiche degli ottimi descrittori del primo livello dello stato trofico di tutti gli ambienti acquatici di transizione.

## Bibliografia

- Admiraal W, Peletier H. Distribution of diatom species on an estuarine mud-flat and experimental analysis of the selective effect of stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1980;46:157-75.
- Basset A, Sabetta L, Fonnesu A, Mouillot D, Do Chi T, Viaroli P, Giordani G., Reizopoulou S, Abbiati M, Carrada GC. Typology in Mediterranean transitional waters: new challenges and perspectives. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2006;16:441-55.
- Bricker SB, Ferreira JG, Simas. T. An integrated methodology for assessment of estuarine trophic status. *Ecological Modelling* 2003;169:39-60.
- Comunità Europea. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 327/1 del 22.12.2000.

- Comunità Europea. *Implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance Document N12. Horizontal guidance on the role of wetlands in the Water Framework Directive, 17<sup>th</sup> December 2003*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2003
- Danielidis DB, Mann DG. New species and new combinations in the genus *Seminavis* Mann 1990 (Bacillariophyta). *Diatom Research* 2003;18:21-39.
- Dell'Uomo A. *L'Indice Diatomico di Eutrofizzazione/Polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti. Linee Guida*. Roma: APAT, CTN AIM; 2004.
- Della Bella V, Puccinelli C, Marcheggiani S, Mancini L. Benthic diatom communities and their relationship to water chemistry in wetlands of central Italy. *Annales de Limnologie Internationale Journal of Limnology* 2007;43 (2):95-105.
- EN 13946. Water quality. Guidance Standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatom samples from rivers. Brussels: European Committee for Standardization; 2002.
- EN 14407. Water quality. Guidance Standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters. Brussels: European Committee for Standardization; 2004.
- Fanuko N, Valčić M. Phytoplankton composition and biomass of the northern Adriatic lagoon of Stella Maris, Croatia. *Acta Botanica Croatica* 2009;68:29-44.
- Ferreira G, Nobre AM, Simas TC, Silva MC, Newton A, Bricker SB, Wolff WJ, Stacey PE, Sequeira A. A methodology for defining homogeneous water bodies in estuaries e application to the transitional systems of the EU water Framework Directive. *Estuarine, Coastal & Shelf Science* 2006;66:468-82.
- Haubois AG, Sylvestre F, Guarini JM, Richard P, Blanchard GF. Spatio-temporal structure of the epipellic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes- Oleron Bay, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 2005;64:385-94.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. *Convention on Wetlands of International Importance especially as Waterfowl Habitat. Ramsar (Iran)*. IUCN; 1971.
- Kelly MG, Cazaubon A, Coring E, Dell'Uomo A, Ector L, Goldsmith B, Guasch H, Hurlimann J, Jarlman A, Kawecka B, Kwandrans ., Laugaste R, Lindstrom E.A, Leitao M, Marvan P, Padišak J, Pipp E, Prygiel J, Rott E, Sabater S, van Dam H, Vizinet J. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* 1998;10:215-224.
- Kelly MG, Whitton BA. The Trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *Journal of Applied Phycology* 1995; 7:433-44.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. Bacillariophyceae 1 Teil: Naviculaceae In: Ettl H (Ed.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag; 1986.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. Bacillariophyceae 2 Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: Ettl H (Ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag; 1988.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. Bacillariophyceae 3 Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Ettl H (Ed.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag; 1991°.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. Bacillariophyceae 4 Teil: Achnathaceae Kritische Ergänzungen zu Navicula und Gomphonema In: Ettl H (Ed.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag; 1991b.
- Krammer K. *Cymbella*. Ruggell: Gantner Verlag, 2002. (Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, Volume 3).
- Krammer K. *Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocybella, Supplements to Cymbelloid taxa*. Ruggell: Gantner Verlag, 2003. (Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, Volume 4).

- Krammer K. *The Genus Pinnularia*. Ruggell: Gantner Verlag, 2000. (Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, Volume 1).
- Lange-Bertalot H. *Navicula sensu stricto, 10 Genera Separated from Navicula sensu stricto, Frustulia*. Ruggell: Gantner Verlag, 2000. (Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, Volume 2).
- Mann DG. Description of Seminavis genera. In: *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. p. 572-3.
- McLusky DS, Elliott M. Transitional waters: A new approach, semantics or just muddying the waters? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 2007;71:359-63.
- Miho A, Witkowski A. Diatom (Bacillariophyta) flora of Albanian coastal wetlands taxonomy and ecology: A review. *Process Californian. Academy Sciences* 2005;56:129-45.
- Prygel J, Coste M. Les diatomées et le diagnostic de la qualité des eaux courants continentales: les principales méthodes indiciaires. *Vie Milieu* 1995;45:179-86.
- Prygiel J, Coste M. Progress in the use of diatoms for monitoring rivers in France. In: Prygiel J, Whitton BA, Bukowska J (Ed.). *Use of algae for monitoring rivers III*. Douai: Agence de l'Eau Artois-Picardie, 1999. p.165-79
- Puccinelli C. Diatomee e macroinvertebrati delle zone umide e delle acque di transizione. [Tesi di Laurea]. Università degli Studi La Sapienza di Roma, 2007.
- Round FE, Crawford RM, Mann DG (Ed.). *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
- Rovira L, Trobajo R, Ibáñez C. Periphytic diatom community in a Mediterranean salt wedge estuary: the Ebro Estuary (NE Iberian Peninsula). *Acta botanica Croatica* 2009;68 (2):285-300.
- Tagliapietra D, Volpi Ghirardini A. Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case study. *Aquatic conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2006;16:457-67.
- Tomasino M. Acque di transizione. In: Marchetti R (Ed.) *Ecologia applicata*. Biella: Società Italiana di Ecologia" Ed. CittàStudi; 1995, p. 151-76.
- Trobajo R, Quintana XD, Sabater S. Factors affecting the periphytic diatom community in Mediterranean coastal wetlands (Empordà wetlands, NE Spain). *Archiv für Hydrobiologie* 2004;160:375-399
- Underwood GJC, Philips J, Saunders K. Distribution of estuarine benthic diatom species along salinity and nutrient gradients. *European Journal of Phycology* 1998;33:173-83.
- Van Dam H, Mertens A, Sinkeldam J. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. Netherlands. *Journal of Aquatic Ecology* 1994;28:117-33.
- Witkowski A, Lange-Bertalot H, Metzeltin D. *Diatom Flora Ofmarine Coasts I. Iconographia Diatomologica 7*. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G 2000.
- Zalat A, Vildary SS. Distribution of diatom assemblages and their relationship to environmental variables in the surface sediments of three northern Egyptian lakes. *Journal of Paleolimnology* 2005;34:159-74.

# VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEI SEDIMENTI NEI CORPI IDRICI: ATTIVITÀ ISTITUZIONALE E DI RICERCA

Mario Carere

*Reparto Suolo e rifiuti, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Il sedimento rappresenta la matrice in cui la maggior parte delle specie presenti nei corpi idrici svolgono gran parte del loro ciclo vitale e quindi costituisce una componente fondamentale dei bacini idrografici. In Europa e in Italia sono presenti corpi idrici superficiali (fluviali, lacustri, marini, di transizione) caratterizzati da una contaminazione dei sedimenti da parte di sostanze persistenti tossiche e bioaccumulabili quali metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici, PCB, “Diossine”, pesticidi organo clorurati, inquinanti emergenti. I sedimenti contaminati possono quindi causare effetti acuti e cronici sugli organismi acquatici, in particolare quelli che vivono sul fondale dei corpi idrici (bentonici). I contaminanti bioaccumulabili, inoltre, possono trasferirsi all’uomo sia attraverso il consumo di organismi eduli bentonici (ad esempio vongole), sia anche attraverso il consumo di specie ittiche (ad esempio orate, carpe, anguille, agoni) la cui dieta è rappresentata da organismi che vivono nel sedimento. Risulta quindi necessaria un’attività sia di tipo istituzionale che di ricerca al fine di valutare la qualità dei sedimenti contaminati e attuare le misure gestionali più idonee per migliorare la qualità dei corpi idrici e raggiungere gli obiettivi ambientali previsti dalle normative Europee e nazionali.

In tale relazione saranno descritti alcuni esempi di attività istituzionale e di ricerca svolti dal Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria in merito alla tematica dei sedimenti contaminati.

## Attività istituzionale a livello europeo

La Direttiva Europea 2008/105/CE – che individua standard di qualità ambientali per le sostanze dell’elenco di priorità europeo (1), pubblicata a seguito di un lungo iter normativo di approvazione da parte del Consiglio e del Parlamento Europeo – consente agli Stati Membri di fissare standard di qualità ambientali dei sedimenti per corpi idrici specifici ai fini della classificazione dello stato chimico dei corpi idrici superficiali. Lo stato chimico di un corpo idrico ai sensi della Direttiva Quadro Acque (2) è, infatti, rappresentato dalla conformità delle concentrazioni delle sostanze dell’elenco di priorità europee rispetto a definite soglie protettive sia per la salute umana che per l’ambiente. Gli Stati Membri possono individuare gli standard di qualità per alcune sostanze nella matrice sedimento garantendo però che vi sia un’adeguata protezione dell’intero corpo idrico compresa la colonna d’acqua.

La Direttiva Europea prevede inoltre l’obbligo di monitorare i trend a lungo termine degli inquinanti nei sedimenti per determinate sostanze, da svolgere nell’ambito del monitoraggio di

sorveglianza previsto dalla Direttiva Quadro Acque al fine di garantire l'obiettivo del non deterioramento dei corpi idrici.

Nell'ambito della strategia di implementazione comune (*Common Implementation Strategy*, CIS) della Direttiva Quadro Acque, sulla base della pubblicazione della citata Direttiva Europea, la Commissione ha quindi deciso di svolgere un'attività nell'ambito del gruppo di lavoro europeo specifico per gli aspetti chimici (*Working Group on Chemical Aspects*) relativa all'armonizzazione dei criteri di monitoraggio e di valutazione della qualità dei sedimenti.

A tale riguardo il Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità, in coordinamento con il Ministero dell'Ambiente, della Tutela del Territorio e del Mare è focal point per l'Italia del citato working group che è composto da rappresentanti di tutti gli Stati Membri, dalle Associazioni Industriali e Ambientali Europee.

Il Dipartimento svolge quindi, nell'ambito di tale Working Group, un ruolo istituzionale anche attraverso la collaborazione con gli istituti nazionali ISPRA (Istituto Superiore per la protezione e Ricerca Ambientale) e IRSA-CNR (Istituto di Ricerca sulle Acque- Consiglio Nazionale delle Ricerche), che si estrinseca attraverso una serie di attività:

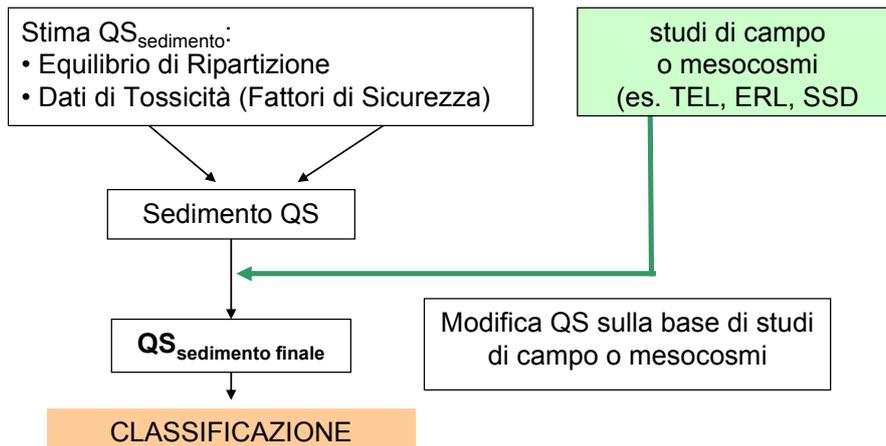
- elaborazione di linee guida, report tecnici e metodologie di supporto alle Direttive europee;
- elaborazione di proposte di direttive da parte della Commissione Europea;
- elaborazione dati di monitoraggio nazionali da inviare alla Commissione Europea e supporto per elaborazione database europei;
- partecipazione ai meeting dei gruppi di lavoro (in coordinamento con il Ministero dell'Ambiente e altri Istituti Nazionali).

Per quanto riguarda il monitoraggio chimico in particolare l'Italia (Istituto Superiore di Sanità, IRSA-CNR e Ministero dell'Ambiente) ha coordinato, insieme alla Francia e alla Commissione Europea l'elaborazione di una linea guida europea per il monitoraggio delle sostanze chimiche nei sedimenti e nel biota (3) che è disponibile pubblicamente sul sito CIRCA della Commissione Europea [www.forum.europa.eu.int](http://www.forum.europa.eu.int).

Il documento è stato redatto nell'ambito della citata strategia di implementazione comune della Direttiva Quadro Acque e rappresenta per gli Stati Europei uno strumento tecnico strategico di supporto per il monitoraggio e la classificazione dello stato chimico ed ecologico dei corpi idrici superficiali al fine di proteggere la salute umana e l'ambiente ed è stato elaborato a seguito di un iter che è durato oltre due anni. La linea guida è stata infatti discussa e approvata, nel corso di numerosi meeting, da rappresentanti di istituti scientifici e ministeri degli Stati Membri Europei, dalla Commissione Europea, dalle associazioni industriali (tra cui CEFIC, Eurometaux, Eurochlor), dalle organizzazioni ambientaliste (tra cui WWF, Greenpeace, EEB) e da rappresentanti delle Convenzioni Marine (UNEP-MAP, HELCOM, OSPAR). La linea guida contiene criteri tecnici riguardanti le strategie di monitoraggio nelle acque interne, marine e di transizione (modalità di campionamento, frequenza, scelta dei siti, selezione delle sostanze, metodiche analitiche, selezione delle specie), nonché informazioni riguardanti l'incertezza delle misure analitiche, i controlli di qualità e tecniche innovative di monitoraggio (campionamento passivo, analisi diretta degli effetti); il documento è anche corredato da una serie di casi studio, proposti da diversi Stati Membri tra cui l'Italia per il bacino del Tevere (ISS). Tali criteri costituiscono un supporto tecnico per l'attuazione della citata Direttiva Europea 2008/105/EC e della Direttiva Europea 2009/90/EC riguardante le disposizioni tecniche per il monitoraggio e rappresentano anche un ausilio per la futura revisione dei piani di gestione dei bacini idrografici.

Per quanto riguarda la valutazione della qualità dei sedimenti il Dipartimento ha contribuito anche all'elaborazione di una linea guida europea per la definizione degli standard di qualità ambientali per acqua, sedimenti e biota. Tale linea guida, che sarà pubblicata a breve, è stata

recentemente approvata dai Direttori Europei delle Acque e rappresenterà un importante ausilio per gli Stati Membri al fine della definizione di standard di qualità dei sedimenti. Nell'ambito di tale linea guida è stata, infatti, elaborata una metodologia che consente di utilizzare sia l'approccio dell'equilibrio di ripartizione, sia l'applicazione di saggi ecotossicologici e relativi fattori di sicurezza. Un'importante novità, rispetto ai citati criteri già presenti nel *Technical Guidance Document* europeo (4) è l'introduzione di una possibile correzione del valore finale, attraverso l'utilizzo di studi statistici di campo quali ad esempio quello definito dei livelli di effetti soglia (TEL/ERL) (Figura 1).



**Figura 1. Metodologia europea in fase di pubblicazione per la derivazione di standard di qualità dei sedimenti**

In tale linea guida è inoltre previsto che, in caso di incertezza relativo al valore definito per i sedimenti, gli stati membri dovrebbero elaborare dei monitoraggi basati anche sull'utilizzo di saggi ecotossicologici e biomarker per valutare l'effettiva biodisponibilità dei contaminanti presenti nel sedimento.

Un'altra attività di routine istituzionale che viene svolta periodicamente è quella relativa all'invio di dati di monitoraggio provenienti dalle diverse regioni italiane. A tal fine la Commissione Europea nel 2007 ha avviato un'attività con l'obiettivo di revisionare la lista delle sostanze dell'elenco europeo di priorità, che ha previsto l'elaborazione di dati di monitoraggio nei corpi idrici superficiali provenienti da tutti gli stati europei; nell'ambito di tale attività l'Italia è risultato il quarto stato europeo come numero di dati di monitoraggio inviati. Ad oggi la Commissione Europea, a seguito di tale attività, possiede un database di 14 milioni di dati analitici su oltre 800 sostanze pericolose che sono consultabili on-line attraverso l'ausilio di una password.

L'Italia, con il coordinamento del Ministero dell'ambiente, ha inviato dati relativi all'acqua, ai sedimenti e al biota.

Nell'ambito della citata attività di revisione delle sostanze prioritarie il Dipartimento di Ambiente (Reparto Suolo e rifiuti e Reparto Chimica tossicologica) ha supportato il Ministero dell'Ambiente per quanto riguarda l'elaborazione di uno specifico dossier sulle diossine che ha incluso, tra l'altro, informazioni sulle emissioni a livello europeo, dati di monitoraggio per acqua, sedimenti e biota, e anche una proposta di standard di qualità dei sedimenti e del biota. Tale report, che è stato supportato anche dalla Svezia e dall'Olanda, è stato trasmesso alla

Commissione Europea e sarà oggetto di valutazione da parte del comitato scientifico SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks) della Commissione Europea.

## Attività istituzionale: elaborazione delle normative

Sulla base delle disposizioni provenienti dalle direttive comunitarie il Ministero dell’Ambiente ha l’obbligo di elaborare decreti nazionali per adempiere agli obblighi comunitari rispettando le scadenze previste. A tal fine il Ministero dell’Ambiente ha istituito un tavolo di coordinamento che ha coinvolto l’ISS (Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria), l’IRSA-CNR, ISPRA (ex-APAT ed ex-ICRAM), le Regioni e le ARPA.

Per quanto riguarda l’individuazione degli standard di qualità dei sedimenti, il Ministero, sulla base degli obblighi e delle opzioni provenienti dalla Direttiva 2008/105/CE, ha stabilito di individuare standard di qualità per 27 sostanze nelle acque marino-costiere e di transizione; per alcune sostanze infatti il monitoraggio nella colonna d’acqua è dispendioso in termini economici ed è poco significativo dal punto di vista scientifico e ambientale; alcune sostanze per le loro proprietà chimico-fisiche tendono a depositarsi sul fondo dei corpi idrici e adsorbirsi alla matrice solida (sedimento).

Gli elementi considerati nella definizione degli standard di qualità dei sedimenti italiani sono stati:

- criteri ecotossicologici (principalmente TEL: *Threshold Effect Level*);
- dati di monitoraggio;
- criteri di tossicità umana (per alcune sostanze);
- livelli di background naturali (per i metalli).

Tali standard di qualità ambientali sono stati discussi con tutti gli istituti scientifici nazionali e approvati nell’ambito di riunioni coordinate dal Ministero. Sono stati individuati ufficialmente attraverso la pubblicazione del decreto ministeriale n. 56 del 2009 (5). Ulteriori disposizioni per il monitoraggio dei sedimenti sono state definite attraverso la pubblicazione del decreto legislativo n.219 del 10 dicembre 2010 (6) che ha pienamente recepito la Direttiva 2008/105/CE e la Direttiva 2009/90/CE sui controlli e garanzie di qualità dei dati analitici (Tabella 1).

**Tabella 1. Alcune sostanze pericolose e standard di qualità ambientali per i sedimenti nella normativa nazionale (corpi idrici marino-costieri e di transizione)**

Sostanze	Concentrazioni (peso secco)
Cadmio	0,3 mg/kg
Mercurio	0,3 mg/kg
Nichel	30 mg/kg
Piombo	30 mg/kg
Tributilstagno	5 µg/kg
Benzo(a)pirene	30 µg/kg
Antracene	45 µg/kg
Fluorantene	110 µg/kg
Lindano	35 µg/kg
PCDD, PCDF e PCB diossina simili-TE	2x10 <sup>-3</sup> µg/kg

## Attività istituzionale: siti di bonifica di interesse nazionale

L'attività istituzionale risulta fondamentale anche in relazione alle problematiche che derivano dalla presenza di una contaminazione chimica dei sedimenti in alcuni dei Siti di bonifica di Interesse Nazionale (SIN). Diversi siti di bonifica di interesse nazionale contengono corpi idrici o parti di bacini idrografici caratterizzati da una forte contaminazione dei sedimenti causata da attività industriali pregresse con presenza di sostanze con caratteristiche di persistenza e bioaccumulo quali metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici, PCB, "Diossine", pesticidi organoclorurati (7). In tali siti di bonifica o in aree adiacenti sono spesso presenti anche attività di acquacoltura, molluschicoltura, pesca dilettantistica o professionale che possono quindi essere influenzate dal rilascio di tali sostanze con conseguenti possibili effetti per la salute umana. A tal fine il Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria supporta il Ministero dell'Ambiente in particolare in merito alla valutazione di rischio sanitario derivante dalla contaminazione dei sedimenti con particolare riferimento al rischio derivante dal consumo di prodotti ittici.

Il supporto al Ministero viene svolto attraverso:

- elaborazione di pareri richiesti per gestire particolari criticità;
- elaborazione di criteri di qualità dei sedimenti con diverse finalità (es. valori intervento);
- attività analitiche in SIN con particolare interesse sanitario;
- attività per convenzioni;
- partecipazione alle Conferenze di Servizi per i SIN previste dalla normativa nazionale.

Un esempio di attività, espletata di recente, è stata la richiesta da parte del Ministero dell'Ambiente di individuare criteri di qualità dei sedimenti protettivi per la salute umana nel sito di bonifica dei laghi di Mantova per sostanze pericolose quali metalli pesanti, IPA, DDT e PCB.

Per quanto riguarda la valutazione degli effetti sulla salute umana causati dai sedimenti contaminati in relazione all'ingestione di prodotti acquatici edibili non esistono criteri convalidati a livello europeo e internazionale. La Direttiva Quadro Acque, ai fini della protezione della salute umana, prevede l'analisi della colonna d'acqua (in relazione al possibile rischio derivante dal consumo di acqua potabile) o l'analisi della contaminazione chimica direttamente negli organismi acquatici; per quanto riguarda i sedimenti viene comunque lasciata agli Stati Membri l'opportunità di individuare criteri che possano proteggere sia la salute umana che l'ambiente.

Gli approcci possibili per individuare criteri di qualità dei sedimenti protettivi per la salute umana si basano sull'utilizzo di fattori di accumulo biota-sedimento (BSAF), sull'utilizzo di analisi di regressione, sull'utilizzo di fattori di trasferimento trofico, sull'utilizzo del principio dell'equilibrio di ripartizione. Nello Stato di Washington (7), in particolare, è stata individuata una metodologia per gli inquinanti organici che tiene conto dell'utilizzo di fattori di ripartizione sedimento/biota e che potrebbe essere applicata per derivare criteri di qualità dei sedimenti per la protezione della salute umana nei siti di bonifica di interesse nazionale (8).

L'approccio utilizzato a Mantova ha previsto l'utilizzo di fattori di accumulo biota-sedimento (*Biota Sediment Accumulation Factor*, BSAF). Il BSAF (9) misura quantitativamente la capacità di trasferimento di composti bioaccumulabili dai sedimenti agli organismi acquatici: per definizione esso rappresenta il rapporto tra la concentrazione della sostanza nel tessuto (normalizzato rispetto al contenuto lipidico) rispetto alla concentrazione nel sedimento (normalizzato al contenuto di carbonio organico). Il BSAF può essere calcolato sito-specifico se si conoscono i dati dell'area indagata relativi alla concentrazione del contaminante nel

sedimento e nel biota, al contenuto di TOC (*Total Organic Carbon*: carbonio organico totale) nel sedimento e di lipidi nel biota; in assenza di queste informazioni si possono prendere in esame BSAF derivanti da banche dati e selezionati per tipologia di specie acquatica che dovrà essere affine a quella presente nel sito. Tali criteri di qualità potrebbero costituire un ausilio per regolamentare attività di pesca o anche per dare raccomandazioni alla popolazione in relazione al consumo di specie ittiche. L'applicazione di criteri di qualità dei sedimenti protettivi per la salute umana potrebbe essere utile anche per stabilire l'ampiezza delle aree che dovrebbero essere bonificate attraverso vari tipi di intervento (dragaggio, capping, monitoraggio di indagine).

## Attività di ricerca

La problematica relativa alla valutazione e conseguente gestione dei sedimenti contaminati richiede anche un'attività di ricerca applicata che in alcune specifiche situazioni risulta fondamentale per indirizzare le attività di gestione e di bonifica.

Per individuare un valore cautelativo nel sedimento protettivo per la salute umana è necessario progettare preliminarmente uno studio *ad hoc* sito specifico in cui i campionamenti delle diverse matrici dovrebbero essere effettuati nella stessa stazione e nello stesso periodo per individuare eventuali correlazioni

Un esempio di tale attività è il progetto in corso, su incarico del Commissario delegato al risanamento della Laguna di Orbetello, riguardante la valutazione di fattori igienico-sanitari connessi alla contaminazione di mercurio dei sedimenti della laguna di Orbetello.

L'Istituto Superiore di Sanità sta, infatti, attualmente svolgendo lo studio per stabilire la relazione esistente tra mercurio metallico e metilmercurio nei sedimenti e nel biota, al fine di valutare i fattori di rischio igienico-sanitari dovuti alla contaminazione dei sedimenti e individuare un valore o un range di valori di mercurio nel sedimento protettivi per la salute umana in relazione al consumo di prodotti ittici, con particolare riferimento all'orata e la spigola che sono le specie ai vertici della catena trofica che presentano le maggiori concentrazioni di mercurio.

Per tale progetto è stato necessario integrare le competenze provenienti da diversi reparti anche perchè il ciclo biogeochimico del mercurio nei corpi idrici è complesso e influenzato da parametri chimico-fisici, microbiologici ed ecologici.

I reparti coinvolti nell'attività sono i seguenti: Suolo e Rifiuti; Chimica Tossicologica; Qualità ambientale e Ittiocoltura.

Nel caso del mercurio, che è una sostanza pericolosa prioritaria ai sensi della normativa nazionale ed Europea, il processo fondamentale che determina il rischio per la salute umana è il processo di metilazione e il suo trasferimento nella catena alimentare attraverso il fenomeno della biomagnificazione.

A tal fine il progetto, che è in fase di finalizzazione, ha previsto le seguenti fasi:

- analisi di MeHg e Hg tot negli strati superficiali dei sedimenti su un numero rappresentativo di siti (sulla base dei dati della caratterizzazione effettuata da ISPRA) a diversa contaminazione;
- analisi negli stessi siti del biota edule (trasferimento attivo di organismi filtratori: *mytilus galloprovincialis*);
- analisi di fattori che influenzano la metilazione (batteri solfiti/solfato riduttori), phytobenthos, parametri chimico-fisici (potenziale redox, carbonio organico, pH);

- elaborazione della correlazione tra contaminazione del sedimento e del biota attraverso analisi statistiche e determinazione del BSAF specifico per il metilmercurio e mercurio totale.

## Conclusioni

La problematica della valutazione e gestione dei sedimenti contaminati è attualmente una delle priorità ambientali a livello europeo. Tale riscontro si è avuto anche nell'ambito di una conferenza che si è tenuta a Lille nel 2010 sulla gestione integrata dei bacini idrografici che ha previsto la partecipazione dei più importanti stakeholders europei in ambito ambientale; nell'ambito di tale conferenza i partecipanti hanno votato come prioritaria la tematica dei sedimenti contaminati al fine della futura revisione dei piani di gestione (10).

In conclusione una corretta valutazione della qualità chimica dei sedimenti, basata su criteri scientifici applicabili, rappresenta quindi un ausilio importante per decidere le opzioni da intraprendere sia al fine dell'elaborazione di normative, nazionali o comunitarie, sia al fine delle attività gestionali e di controllo nei siti di bonifica di interesse nazionale. È però necessario che, ad integrazione di un'attività di tipo istituzionale, sia svolta un'azione di ricerca che risulta fondamentale per comprendere l'impatto sull'ambiente e sulla salute umana che può derivare dalla presenza di un determinato livello di concentrazione che può essere differente in base alle caratteristiche sito-specifiche dell'area indagata.

## Bibliografia

1. Unione Europea. Direttiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive del Consiglio 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE, nonché modifica della direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio. *Gazzetta Ufficiale* L348/84.
2. European Union Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *European Official Journal* L327/1.
3. European Commission. *Guidance document No. 25 on chemical monitoring of sediment and biota under the water framework directive*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2010. (Technical Report 2010.3991). Disponibile all'indirizzo: [http://circa.europa.eu/Public/irc/env/wfd/library?l=/framework\\_directive/guidance\\_documents/guidance\\_monitoring/\\_EN\\_1.0\\_&a=d](http://circa.europa.eu/Public/irc/env/wfd/library?l=/framework_directive/guidance_documents/guidance_monitoring/_EN_1.0_&a=d); ultima consultazione 6/10/11.
4. European Chemical Bureau. *Technical guidance document on risk assessment in support of: Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) N°1488/94 on risk assessment for existing substances, Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market. Part II*. European Communities, 2003. Disponibile all'indirizzo [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_activities/health-env/risk\\_assessment\\_of\\_Biocides/doc/tgd/tgdpart2\\_2ed.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/health-env/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd/tgdpart2_2ed.pdf); ultima consultazione 6/10/11.
5. Italia. Decreto ministeriale 14 aprile 2009, n. 56. Regolamento recante criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo. *Gazzetta Ufficiale* n.124 del 30-5-2009.

6. Italia. DL.vo 10 dicembre 2010, n. 219. Attuazione della Direttiva 2008/105/CE relativa a standard di qualità ambientali nel settore della politica delle acque, recante modifica e successive abrogazione delle direttive 82/176/CeE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE nonché modifica della direttiva 2000/60/CE e recepimento della direttiva 2009/90/CE che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio delle acque. *Gazzetta Ufficiale* n. 296 del 20-12-2010.
7. Carere M, Depropriis L, Funari E, Musmeci L, Onorati F. Assessment and management of contaminated sediments in Italian marine coastal waters. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 2008;44(3):239-43.
8. Weiss L. *Developing health-based sediment quality criteria for cleanup sites: a case study report*. Washington State Department of Ecology, 1997. (Ecology Pub. 97-114). Disponibile all'indirizzo: <http://www.ecy.wa.gov/pubs/97114s.pdf>; ultima consultazione 6/10/11.
9. Burkhard LP. Factors influencing the design of bioaccumulative factor and biota-sediment accumulation factor field studies. *Environ Toxicol Chem* 2003;22(2):351-60.
10. Brils J, Quevauviller P, Slob A, Blind M, Davy T, Carere M, Amorsi N, Brack W, Borchers U, Thompson C, Villessot D. The European Water Framework Directive beyond 2010: let actions speak louder than words. *Journal of Environmental Monitoring* 2010; 12(12):2204-6.

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, ottobre-dicembre 2011 (n. 4) 9° Suppl.*