

3. VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA NELLA VALUTAZIONE DI IMPATTO SANITARIO

Mario Carere (a), Ines Lacchetti (a), Walter Cristiano (a), Genesio Scaloni (b), Pierpaolo Nurchis (c), Chiara Suraci (d), Marco Baldini (e), Laura Mancini (a)

(a) *Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *ASUR Marche A.V. 2- UOSD Servizio Prevenzione e Protezione, Jesi (AN)*

(c) *già Dipartimento di Prevenzione zona Centro, Azienda per la Tutela della Salute Sardegna, Cagliari*

(d) *Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente del Friuli Venezia Giulia, Palmanova (UD)*

(e) *Servizio di Epidemiologia Ambientale, Agenzia Regionale Protezione Ambiente Marche, Ancona*

3.1. Introduzione

L'evoluzione socioeconomica e le conseguenti attività produttive comportano il rilascio e l'immissione nell'ambiente di molteplici contaminanti, spesso emergenti, la cui diffusione, interazione ed effetti sulla salute umana sono spesso ignoti o poco conosciuti (Sala & Goralczyk 2013; Brack *et al.*, 2015, Ladrigan *et al.*, 2018).

Come raccomandato negli obiettivi strategici di sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite (2030 *Agenda for Sustainable Development*) (UN, 2015), è necessario adottare un approccio di prevenzione che si basi sulla conoscenza e lo studio degli ecosistemi nella loro globalità. L'obiettivo è quindi quello di individuare e promuovere approcci di prevenzione per mitigare i possibili effetti sulla salute delle popolazioni associati a problematiche complesse quali antropizzazione e inquinamento chimico (Portier *et al.*, 2010; Lowe *et al.*, 2011; Goshua *et al.*, 2021). Inoltre, i cambiamenti climatici comportano un aumento di eventi estremi (Noyes *et al.*, 2009; Crawford *et al.*, 2022) che possono riguardare anche aree dove sono presenti impianti industriali/opere causando ad esempio rotture di impianti di trattamento, risospensione di sedimenti contaminati, dilavamento di suoli con conseguente diffusione della contaminazione chimica. I principali strumenti che si intendono utilizzare a tale fine sono quindi quelli dello studio, dell'analisi e della valutazione degli effetti e degli impatti sugli ecosistemi.

Negli ultimi decenni l'ecotossicologia è emersa come una disciplina che fornisce il quadro teorico e gli strumenti per valutare in maniera integrata lo stato di qualità di ecosistemi (Chapman, 2002) influenzati da contaminazione di tipo chimico. I test ecotossicologici, infatti, possono comprendere o rappresentare diverse parti degli ecosistemi (Mancini, 2002) e tengono conto del fatto che non siamo esposti a singoli fattori di rischio, ma a miscele complesse di contaminanti.

L'uso di strumenti innovativi che possano aiutare a rilevare e comprendere gli effetti nell'ambiente è ampiamente raccomandato dalla comunità scientifica (Wernersson *et al.*, 2015). In questo contesto l'uso di metodi ecotossicologici può dare un forte contributo nella prevenzione della salute degli ecosistemi e dell'uomo. Tali saggi possono essere utilizzati sia per valutare gli effetti dell'immissione e l'autorizzazione nel mercato di diversi contaminanti (es. biocidi, pesticidi, farmaci veterinari, solventi), sia per valutare lo stato di qualità degli ecosistemi acquatici, terrestri e, in alcuni casi, anche aerei (Brack *et al.*, 2019; Atzei *et al.*, 2021). I recenti inserimenti da parte del Legislatore Italiano in diverse norme di materia ambientale sono un esempio di come l'attenzione verso gli *effect-based methods* stia aumentando: ad esempio, la normativa sul dragaggio dei sedimenti marini (DM 15 luglio 2016 n. 173) contiene un approccio integrato chimico-ecotossicologico per valutare la qualità dei sedimenti.

In Europa saggi ecotossicologici (invertebrati e pesci) sono utilizzati anche nell'ambito dei documenti che riguardano le migliori tecnologie disponibili per il trattamento di emissioni in aria e in acqua di impianti industriali di tipo chimico (*Reference Document for Common Waste Water and Waste Gas Treatment/Management Systems in the Chemical Sector*) (Brinkmann *et al.*, 2016).

3.2. Normativa europea ed *effect-based methods*

Un esempio di approccio in evoluzione è quello della Direttiva Quadro Acque (Direttiva 2000/60/CE nota anche come WFD - *Water Framework Directive*) che prevede la classificazione dello stato di qualità dei corpi idrici europei sulla base di programmi di monitoraggio e valutazione dello stato chimico (sostanze prioritarie a livello europeo) e dello stato ecologico (parametri chimico-fisici, ecologici e idromorfologici). Tale legislazione include però solo una piccola frazione delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente. Il Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH: *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals*) ad esempio ha registrato oltre 100.000 sostanze chimiche a cui vanno aggiunti prodotti di trasformazione, metaboliti e anche i processi di degradazione.

Nell'ambito del gruppo di lavoro "WG Chemicals" della WFD l'Italia ha coordinato, insieme alla Svezia, un gruppo di esperti che ha elaborato un rapporto tecnico europeo (Wernersson *et al.*, 2015) sull'applicazione di metodi di monitoraggio basati sugli "effetti" (*effect-based methods*) a supporto delle analisi chimiche nei diversi programmi di monitoraggio nei corpi idrici superficiali.

Il rapporto ha raggruppato tali metodi in saggi di tossicità *in vivo*, *in vitro* e *biomarker*. Tali metodi possono avere diversi obiettivi, tra i quali:

- fungere da sistemi di allerta in relazione a specifici inquinamenti causati da situazioni emergenziali
- rappresentare metodi di screening per poter identificare siti *hotspot* dove la contaminazione è elevata e dove dovrebbero convergere i programmi di monitoraggio chimici;
- rafforzare il link tra stato chimico ed ecologico;
- valutare la qualità degli effluenti e anche delle acque di riutilizzo, sia urbane che industriali;
- valutare la qualità dei sedimenti insieme alle analisi chimiche.

Tali obiettivi rappresentano aspetti fondamentali anche per proteggere la salute umana; la popolazione infatti può essere esposta a inquinanti chimici attraverso l'ingestione di acqua potabile, la balneazione, il consumo di prodotti della pesca contaminati e il consumo di frutta e vegetali irrigati e, quindi, i metodi che possono rilevare ad esempio effetti eco-genotossicologici, eco-neurotossicologici, embriologici, di interferenza endocrina sono altamente raccomandati dalla comunità scientifica.

3.3. Contaminanti emergenti e miscele

I contaminanti emergenti e le miscele di contaminanti scaricate ed emesse quotidianamente da diverse fonti inquinanti diffuse o puntiformi rappresentano un rischio non trascurabile per l'ecosistema e di conseguenza per la salute dell'uomo (Mushtaq *et al.*, 2020).

Queste sostanze spesso non sono rilevate nei monitoraggi routinari o perché non sono contemplate nella legislazione ambientale o perché sono presenti a concentrazioni molto basse (es. i farmaci) (OECD, 2019; Santos *et al.*, 2010).

La maggior parte delle sostanze attualmente in uso non sono incluse quindi nella normativa e gli effetti avversi sono spesso inesplorati sia per ambiente che per l'uomo; infine, molto limitata è la conoscenza dei rischi derivanti dalle miscele (Brack, 2018).

Gli attuali programmi di monitoraggio chimico della WFD dei corpi idrici superficiali, per esempio, si basano esclusivamente su un elenco di sostanze chimiche (sostanze prioritarie, inquinanti specifici del bacino idrografico e *watch-list*) definito attraverso valutazioni di rischio semplificate basate su dati di monitoraggio e modelli di diffusione.

Quando questi composti sono presenti in ambiente come miscele complesse di contaminanti anche con gli stessi “modi di azione”, possono determinare effetti additivi o sinergici che impattano con maggior forza sull'ecosistema circostante

Attraverso test ecotossicologici moderni, si possono identificare e rilevare i *Modes of Action* (MoA) delle sostanze chimiche più rilevanti per ambiente e uomo (es. neurotossicità, genotossicità, cardiotoxicità), nel contesto dello schema concettuale AOP (*Adverse Outcome Pathway*) in modo da coprire la gran parte degli effetti avversi presente nell'ambiente compresi quelli delle miscele sia complesse sia di sostanze con stesso MoA.

È chiaro che per raggiungere tale obiettivo è anche necessario individuare dei criteri di valutazione e dei limiti soglia per poter discriminare lo stato di qualità di un sito.

3.4. Caso studio applicativo

La letteratura scientifica è ricca di esempi di applicazione di metodi ecotossicologici in aree soggette a contaminazione di tipo urbano, agricolo, industriale e in diversi casi tali metodi hanno permesso di individuare effetti tossici non rilevati dalle analisi chimiche.

Un esempio interessante è la ricerca eseguita in Croazia nella città di Virovitica (Babic *et al.*, 2017) relativa ad i reflui di un impianto di trattamento (di tipo secondario) municipale ricevente anche scarichi di un'industria dello zucchero e di un ospedale. Tali reflui confluiscono in un canale che a sua volta si immette nel fiume Drava che ha diversi usi importanti per la popolazione (es. pesca, irrigazione). Il fiume Drava nasce in Italia in Trentino-Alto Adige e percorre quasi 750 km prima di immettersi nel Danubio. Le analisi dei reflui previste dalla legislazione croata includono principalmente parametri chimico-fisici, simile alla legislazione di tutti gli stati europei e risultavano conformi.

I ricercatori hanno utilizzato il modello zebrafish (embrioni) analizzando campioni di reflui in entrata e in uscita dell'impianto, comprendendo anche un sito di controllo. I diversi metodi applicati hanno permesso di scoprire molteplici effetti tossici nel refluo scaricato nel fiume di tipo cardiologico (flusso sanguigno e battito cardiaco), neurologico (comportamento degli embrioni), genotossico (saggio della cometa), embriologico (analisi della mortalità ed effetti subletali) e infine anche l'analisi istopatologica ha evidenziato malformazioni causate da inquinanti chimici. Gli autori dello studio riportano che tali effetti sono stati causati da inquinanti non normati o dall'effetto di miscele tenendo conto che l'impianto riceve scarichi di tipo urbano, industriale e ospedaliero.

È evidente quindi che tali studi sono rilevanti per i gestori al fine di migliorare il livello tecnologico di trattamento, ad esempio di un refluo industriale, in modo da preservare la salute degli ecosistemi e quindi della salute umana.

3.5. Scelta dei metodi

3.5.1. Valutazione ecotossicologica nelle fasi della procedura VIS

Nell'ambito della procedura di Valutazione di Impatto Sanitario (VIS) l'ecotossicologia può fornire un ruolo centrale. Nella fase di *Scoping*, noti i fattori di pressione preesistenti sul territorio, potrebbe essere valutata la possibilità di effettuare indagini ecotossicologiche sia in fase *ante-operam*, sia durante la realizzazione o fase di cantiere e, in seguito, durante la fase di *Monitoring post-operam*. L'approccio consente anche di individuare e valutare potenziali trend degli effetti. L'indagine ecotossicologica per la VIS deve individuare i metodi appropriati e sito-specifici comprendente saggi generici, almeno su tre livelli trofici, di ecotossicità acuta/cronica e saggi di eco-genotossicità, in considerazione della stretta correlazione degli effetti mutageni/genotossici con la salute umana. La scelta dei metodi dovrebbe essere effettuata sia sulla base di informazioni riguardanti l'ecosistema in cui verrà realizzata l'opera (ambiente naturale, ambiente costruito, tipologia dei corpi idrici, ecosistemi acquatici o terrestri) sia sulla base della tipologia di ciclo industriale e dei potenziali inquinanti emessi.

Secondo le Linee Guida VIS dell'Istituto Superiore di Sanità (Dogliotti *et al.*, 2019) l'indagine ecotossicologica è prevista quindi in due fasi della procedura VIS:

- *Fase di Scoping*

Per conoscere i fattori di pressione preesistenti sul territorio e acquisire le informazioni su comparti più sensibili già impattati. A tal fine occorre presentare una descrizione sintetica dello stato di qualità delle matrici ambientali dell'area anche utilizzando studi bibliografici, laddove le informazioni raccolte siano carenti è consigliabile effettuare una valutazione ecotossicologica *ante-operam*. Con tali informazioni sarà possibile, pertanto, individuare anche i punti più idonei e strategici per il piano di campionamento.

Ad esempio, per quanto riguarda i corpi idrici superficiali il monitoraggio dello stato ecologico e chimico e la conformità rispetto agli standard di qualità ambientale rappresenta un elemento iniziale di valutazione importante. Gli standard di qualità ambientali sono derivati infatti sulla base di una metodologia che tiene conto anche di saggi ecotossicologici acuti e cronici e quindi un loro superamento può rappresentare un rischio per gli ecosistemi. Tale aspetto è anche un collegamento importante rispetto alla fase di valutazione dell'esposizione nell'ambito della VIS (*vedi* Capitolo 1).

- *Fase di Monitoring*

Per valutare il trend degli effetti e individuare possibili impatti negativi anche accidentali durante le fasi di avviamento e funzionamento dell'opera. In questa fase l'indagine ha un ruolo chiave per far evidenziare in tempi rapidi eventuali impatti negativi, svolgendo la funzione di *early warning* per poi adottare tempestivamente le opportune misure correttive.

3.5.2. Metodi acque superficiali

Per il comparto acquatico si potrebbe suggerire una batteria con almeno 4 saggi per sito di indagine così distinta:

- due saggi di tossicità acuta con organismi appartenenti a livelli trofici differenti (es. un embrione di pesce e un crostaceo);
- un saggio di tossicità cronica (es. crostaceo o alga);
- un saggio di genotossicità (es. test di Ames o test della cometa).

Per quanto riguarda i metodi *in vivo*, *in vitro*, *biomarker* ed ecogenotossicologici si fa riferimento alle sezioni successive.

3.5.3. Metodi suoli

Per il comparto terrestre si potrebbe suggerire di allestire una batteria di almeno tre saggi:

- un saggio su suolo tal quale (es. vegetali o lombrichi),
- un saggio su elutriato del suolo (es. embrione di pesce o crostaceo)
- un saggio di genotossicità (o su suolo tal quale o su elutriato)

Per quanto riguarda i metodi *in vivo*, *in vitro*, *biomarker* ed ecogenotossicologici si fa riferimento alle sezioni successive.

3.5.4. Metodi acque marino-costiere

In ambiente marino i sedimenti rappresentano la matrice principalmente considerata per le valutazioni ecotossicologiche; in particolare il DM 173/2016 (G.U. n.208) indica i metodi e i criteri di valutazione per la movimentazione di sedimenti in ambito marino.

Per quanto riguarda l'analisi dei sedimenti marini, il DM 173/16 prevede l'esecuzione di tre test ecotossicologici relativi a tre gruppi tassonomici ben distinti:

- 1^a tipologia: saggio sulla fase solida.
- 2^a tipologia: saggio su fase liquida.
- 3^a tipologia: saggio con effetti cronici/sub-letali/a lungo termine e di comprovata sensibilità.

Per ogni tipologia sono proposti diversi organismi, quindi è possibile utilizzare diverse combinazioni dei metodi proposti; a titolo di esempio si illustra una di tali combinazioni:

- 1^a tipologia: Bioluminescenza con *Alivibrio fischeri* su sedimento privato dell'acqua interstiziale.
- 2^a tipologia: Inibizione di crescita algale con *Phaeodactylum tricornutum* su elutriato.
- 3^a tipologia: Embriotossicità con *Crassostrea gigas* su elutriato.

Per quanto riguarda il test con il batterio marino bioluminescente *Alivibrio fischeri* (precedente denominazione *Vibrio fischeri*), il Quaderno ISPRA 4/2021 rappresenta un metodo di riferimento per l'esecuzione della prova.

Il saggio di inibizione algale con la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* può essere eseguito secondo la norma UNI EN ISO 10253:2017. In questo caso viene generalmente analizzato l'elutriato del sedimento. Le modalità per la preparazione dell'elutriato sono specificate nel Quaderno ISPRA 16/2021. Dalla letteratura si evince che *Phaeodactylum tricornutum* è particolarmente sensibile all'esposizione agli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e ai metalli.

Il metodo ISO 17244:2015 descrive le modalità di esecuzione del saggio di embriotossicità con l'ostrica (*Crassostrea gigas*). Esemplari del mollusco vengono messi nelle condizioni di rendere disponibili i gameti per la formazione di embrioni in laboratorio in condizioni standardizzate; gli embrioni appena formati vengono quindi messi a contatto con l'elutriato del sedimento. Le modalità per la preparazione dell'elutriato sono specificate nel Quaderno ISPRA 16/2021 (ISPRA, 2016)

Anche per il comparto marino si suggerisce un saggio di ecogenotossicità, i più utilizzati sono il test della cometa, il test dei micronuclei e il test di Ames.

3.5.5. Test *in vivo*

I test *in vivo* di laboratorio prevedono l'utilizzo di organismi viventi allo scopo di evidenziare e rilevare l'eventuale presenza di effetti causati da contaminanti. Gli organismi elencati nella tabella 3.1 appartengono ai vari livelli della catena trofica, questo perché organismi differenti mostrano spesso anche diversa sensibilità ai singoli inquinanti; inoltre, organismi più complessi, nonostante richiedano spesso l'allestimento di test più impegnativi, hanno spesso una maggior valenza nella ricerca di un possibile rischio per la salute umana. Per questo motivo, test come quello descritto nella OECD 236 (OECD,2013) stanno trovando nel monitoraggio ambientale sempre più una maggior applicazione.

Tabella 3.1. Test *in vivo* generalmente utilizzati per monitoraggi ambientali in acque superficiali

Classi	Specie	Durata	Endpoint
Alghe		72 ore (cronico)	Inibizione della crescita Danno al DNA Stress ossidativo
Batteri	<i>Vibrio fischeri</i>	5/15/30 minuti (acuto)	Inibizione bioluminescenza
Protozoi	<i>Tetrahymena thermophila</i>	24 ore (cronico)	Letalità
Rotiferi	<i>Brachionus Calyciflorus</i>	24 ore (acuto)	Letalità
	<i>Brachionus Plicatilis</i>	48 ore (cronico breve)	Inibizione della crescita
	<i>Thamnocephalus phlatiurus</i>	24 ore (acuto) 15- 30 minuti (rapido)	Letalità Percentuale ingestione
Crostacei	<i>Artemia franciscana</i>	24/96 ore (acuto) 14 giorni (prolungato)	Mortalità
	<i>Acartia tonsa</i>	24 ore (acuto) 7 giorni (semicronico)	Mortalità
	<i>Daphnia magna</i>	24/48 ore (acuto) 21 giorni (riproduzione)	Immobilizzazione Riproduzione
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	24 ore (acuto)	Letalità
	<i>Heterocypris incongruens</i>	6 giorni (cronico)	Letalità Inibizione della crescita
Echinodermi	<i>Paracentrotus lividus</i>	1 ora (acuto) 48/72 ore (acuto)	Motilità spermatica Embriotossicità
Molluschi	<i>Crassostrea gigas</i>	48/ 72 ore (acuto)	Embriotossicità
	<i>Mitylus galloprovincialis</i>	24-48 ore (acuto)	Numero di larve normoformate (teratogenesi)
Piante	<i>Lepidium sativum</i> <i>Sinapis alba</i> <i>Sorghum saccharatum</i> <i>Cucumis sativus</i>	72 ore (cronico)	Inibizione della germinazione e della crescita radicale
Pesci (embrioni)	<i>Danio Rerio</i>	96 ore	Letalità e Subletalità

3.5.6. Test *Fish Embryo Toxicity*

Il test *Fish Embryo Toxicity* (FET) (OECD, 2013) è uno degli strumenti più promettenti nel comprendere e studiare le modalità di azione e tossicità delle sostanze chimiche e delle loro miscele ed è un test che usa il vertebrato “zebrafish” (*Danio rerio*); negli ultimi 20 anni l’uso e l’affermazione di questo organismo-modello sono aumentati esponenzialmente grazie anche ai molteplici vantaggi associati al suo impiego. Nel recente meeting online della SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) del 2020 (SETAC, 2020) sono state oltre 80 gli studi in cui questo organismo è stato utilizzato per comprendere gli effetti delle sostanze chimiche nell’ambiente. I risultati ottenuti con zebrafish, inoltre, non sono solo paragonabili ad altre specie di vertebrati superiori, ma anche agli esseri umani in relazione alla somiglianza delle risposte fisiologiche in particolare negli stadi embrionali. Tale test è anche suggerito nell’ambito del principio delle 3R (*Reduction, Replacement, Refinement*).

La versatilità di questo test consiste inoltre nella possibilità di osservare endpoints sub-letali, che segnalano la presenza di una tossicità che non ha però portato l’organismo alla morte, e che possono quindi dare informazioni aggiuntive circa la tossicità di un campione ambientale. Questi endpoints possono quindi avere rilevanza nel determinare la presenza di ulteriori MoA che possono rappresentare un rischio per la salute umana, come:

- Neurotossicità;
- cardiotoxicità;
- teratogenicità;
- genotossicità;
- interferenza endocrina;
- frequenza cardiaca;
- flusso sanguigno;
- morfologia.

3.5.7. Test *in vitro*

I test *in vitro* prevedono l’utilizzo di colture cellulari e tessuti in alternativa agli organismi, sono anche suggerite quindi perché conformi al principio delle 3R per il benessere animale. Il vantaggio di queste tecniche consiste nell’aver una elevata riproducibilità, in quanto vengono utilizzate in un ambiente totalmente controllato, cosa generalmente non realizzabile con le tecniche *in vivo*.

La possibilità, inoltre, di osservare la risposta di una sostanza o di una miscela su un singolo tipo cellulare o un tessuto possono rappresentare un vantaggio nel momento in cui è necessario determinarne gli effetti senza avere le interferenze provocate dalla complessità di un intero organismo.

Inoltre, la quantità di campione necessaria per lo svolgimento del test è generalmente più ridotta, mentre i tempi di risposta sono spesso minori. Tra le tecniche maggiormente utilizzate in questo campo c’è il CALUX, che sfrutta l’espressione della luciferasi in cellule ingegnerizzate come risposta all’attivazione di un recettore dovuta al legame con sostanze chimiche. Nell’ambito del monitoraggio ambientale, il CALUX può rispondere all’interazione con il recettore arilico (AhR-CALUX) o con il recettore estrogeno alfa (ER-CALUX), per la rilevazione, rispettivamente, della contaminazione complessiva con diossine e PCB-diossina simili oppure con composti ad azione estrogenica.

La Tabella 3.2 riporta i test *in vitro* che prevedono l’utilizzo delle colture cellulari.

Tabella 3.2. Test *in vitro* che prevedono l'utilizzo delle colture cellulari

Linea cellulare	Durata del test	Endpoint
Cellule U2OS Gr CALUX Dr CALUX Ar CALUX Er CALUX	3 giorni	Morte cellulare Invecchiamento cellulare Limite massimo
Cellule EPC (pesce)	5 giorni	Morte cellulare

3.5.8. Biomarker

In ecotossicologia i *biomarker* vengono definiti come “quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione), la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (Wernersson *et al.*, 2015). Gli organismi utilizzati nel rilevamento dei *biomarker* (detti bioindicatori) sono generalmente prelevati *in situ* e devono quindi essere scelti con attenzione in base alla sensibilità che mostrano alle sostanze di cui si andranno a ricercare gli effetti. Attraverso l'uso di *biomarker* è possibile osservare in tempi rapidi gli effetti dell'esposizione ad un campione, avendo al tempo stesso in alcuni casi una risposta rappresentativa dello stato fisiologico dell'organismo.

I *biomarker*, come ad esempio EROD (etossiresorufina-O-deetilasi), forniscono un'indicazione sui cambiamenti cellulari a livello enzimatico e spesso rappresentano il primo segnale di allarme di un disturbo ambientale. EROD può essere utilizzato per rilevare l'esposizione a classi di inquinanti organici quali PCB co-planari, Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), dibenzodioxine planari (PCDD) e dibenzofurani (PCDF). Le metallotioneine sono un classico esempio di *biomarker* di effetto, sono proteine conservate e riscontrate in una ampia varietà di organismi, la loro presenza è spesso indice di esposizione a metalli quali Cd, Zn, Hg, e Cu. Per questo motivo i molluschi marini, in grado di accumulare i metalli dagli ambienti in cui vivono vengono spesso usati per la ricerca di questo *biomarker*. Un altro esempio di *biomarker* che trova applicazione nel biomonitoraggio è quello osservato nel test di stabilità delle membrane lisosomiali. Questi piccoli organelli, circondati da membrana e contenenti enzimi idrolitici possono essere infatti usati in un test in cui attraverso colorazione si va ad osservare il tempo necessario per la degradazione della membrana stessa a seguito di un trattamento con un buffer acido. A tempi minori corrisponde una condizione di stress dovuta potenzialmente all'esposizione a contaminanti.

3.5.9. Metodi eco-genotossicologici

L'utilizzo di metodi eco-genotossicologici è rilevante al fine di adottare misure di protezione della biodiversità e della salute umana. Grazie a tali metodi, infatti, è possibile determinare gli effetti degli inquinanti ambientali a livello genetico. Molte sostanze chimiche di origine antropogenica rilasciate nell'ambiente in seguito alle più disparate attività possono infatti arrecare danni al materiale genetico delle cellule attraverso interazioni con la sequenza e la struttura del DNA, come ad esempio nel caso di alterazioni cromosomiche o delle sequenze geniche. Tra i metodi eco-genotossicologici si distinguono i saggi che utilizzano organismi modello (*in vivo*) e quelli che invece non ne fanno ricorso (*in vitro* e *in silico*). Per lo svolgimento dei test *in vitro* si utilizzano invece linee cellulari od organismi unicellulari sia procarioti che eucarioti. Le diverse tipologie di test eco-genotossicologici possono anche essere classificate in base al tipo di danno

che è possibile evidenziare dal singolo metodo. Inoltre, questi test sono in grado di evidenziare presenza di sostanze e/o miscele genotossiche in tutte le matrici ambientali. Tra i test maggiormente utilizzati nei monitoraggi ambientali vi sono il test della cometa, il test con i micronuclei e il test di Ames.

3.6. Esempio applicativo: il rigassificatore di Ravenna

Un esempio di applicazione della fase di *Monitoring* è rappresentato dall'applicazione della valutazione ecotossicologica per quanto riguarda il rigassificatore di Ravenna.

Nell'ambito delle iniziative legate alla realizzazione di nuove capacità di rigassificazione mirate a diversificare le fonti di approvvigionamento di gas ai fini della sicurezza energetica nazionale, la Società Snam FSRU Italia, in data 8 luglio 2022 ha sottoposto l'istanza autorizzativa per l'ormeggio di un mezzo navale tipo FSRU (*Floating Storage and Regasification Unit*) da ormeggiarsi in corrispondenza della piattaforma *offshore* esistente posta a circa 8,5 km a largo di Punta Marina (cosiddetto Progetto FSRU Ravenna) incluse le connesse infrastrutture per l'allacciamento alla rete di trasporto gas esistente. L'FSRU sarà in grado di stoccare fino a 170.000 m³ di Gas Naturale Liquefatto (GNL), rigassificarlo e trasferirlo in una nuova condotta che lo convoglierà nel punto di connessione alla Rete Gasdotti posto a circa 42 km dal punto di ormeggio presso la piattaforma esistente *offshore* Petra.

Risulta chiaro che un'opera di questo tipo l'impatto potenziale non riguarda solamente le acque marino-costiere, ma potrebbe riguardare anche i suoli (per lo scavo del metanodotto) e le acque superficiali connesse.

In tale caso il piano di monitoraggio ecotossicologico è stato efficacemente concordato tra Istituto Superiore di Sanità e Proponente, il quale ha recepito pienamente le richieste ed ha proposto un piano che prevede i seguenti metodi:

- *Acqua marina*
 - Test ecotossicologici di tossicità acuta: saggio di tossicità acuta con il batterio marino luminescente *Vibrio fischeri* (ISO 11343-3:2019),
 - Test ecotossicologici di tossicità cronica: inibizione di crescita algale con *Pheodactylum tricornutum* (UNI EN ISO 10253:2006),
 - Test di genotossicità: saggi test della cometa e del micronucleo (MN test) che rappresentano i più rilevanti biomarcatori di effetto per organismi esposti a contaminanti chimici come gli IPA o metalli, e saggi Salmonella/microsome test test di Ames) che consentono di tenere sotto controllo la formazione di sottoprodotti durante il processo di clorazione dell'acqua (OECD 471:1997);
- *Sedimenti marini*
 - Saggio sulla fase solida: bioluminescenza con *Vibrio fischeri* su sedimento privato dell'acqua interstiziale,
 - Saggio su fase liquida: inibizione di crescita algale con *Pheodactylum tricornutum* su elutriato,
 - Saggio con effetti cronici/sub-letali/a lungo termine: embriotossicità con *Paracentrotus lividus* (*Mytilus galloprovincialis*), su elutriato;
- *Suoli*:
 - saggio ecotossicologico sul suolo tal quale (TQ): test di fitotossicità con *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* e *Sorghum saccharatum* (UNI 11357:2010);

- saggio su elutriato del suolo (estratto acquoso dei suoli -EA): saggio di tossicità acuta con il crostaceo *Daphnia magna* (ISO 6341:2013);
 - Saggio di tossicità cronica con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692:2012);
 - saggio di genotossicità sull'estratto organico del suolo (EO) mediante saggi *Salmonella*/microsome test (Ames test).
- *Acque superficiali interne:*
- Test ecotossicologici di tossicità acuta: saggio di tossicità acuta con il crostaceo *Daphnia magna* (ISO 6341:2013),
 - Saggio di tossicità con embrioni di pesce (OECD 236:2013);
 - Test ecotossicologici di tossicità cronica: saggio di tossicità cronica con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692:2012),
 - Test di genotossicità: test della cometa o saggi *Salmonella*/microsome test (Ames test) (OECD 471:1997).

Tale importante piano di monitoraggio consentirà negli anni di rilevare e prevenire gli effetti potenzialmente causati, da inquinanti emessi dall'opera, e anche delle miscele, negli ecosistemi acquatici e terrestri con benefici importanti indiretti anche per la salute umana, potendo precocemente segnalare eventuali effetti negli ecosistemi prima che questi possano produrre impatti sulla salute umana.

3.7. Interpretazione dei risultati ai fini della procedura VIS

L'applicazione corretta della valutazione ecotossicologica prevede quindi la scelta di una batteria che indaghi la qualità dell'ecosistema circostante (acquatico e terrestre) attraverso la conduzione di saggi sia ecotossicologici che eco-genotossicologici. I risultati ottenuti vengono classificati secondo lo schema della Figura 3.1 delle Linee Guida VIS.

Nell'interpretazione dei risultati, non viene richiesta una classificazione quantitativa dell'effetto tossico rivelato, ma dovrà essere segnalata solo la presenza di un effetto tossico per il test applicato secondo quanto previsto dalla norma di riferimento selezionata.

A titolo esemplificativo, sulla base dei risultati ottenuti si possono verificare 4 casi:

1. nessuna presenza di ecotossicità ed eco-genotossicità;
2. ecotossicità rilevata;
3. eco-genotossicità rilevata;
4. ecotossicità ed eco-genotossicità rilevata.

Nel primo caso non verrà attivato nessun sistema di allerta all'interno del processo VIS e si continuerà col monitoraggio secondo quanto programmato nel piano presentato ossia almeno una volta l'anno.

Nel caso 2 e 3 sarà attivato nel più breve tempo possibile il sistema di allerta, avvisando tutte le parti coinvolte nel processo, analizzando con maggior dettaglio gli inquinanti emessi in tutte le fasi del processo anche attraverso nuovi saggi più specifici a seconda del tipo di tossicità rilevata e analisi chimiche più mirate. Il piano di monitoraggio dovrà essere variato e integrato delle informazioni così acquisite, le analisi dovranno essere ripetute più frequentemente (es. 1 volta al mese) fino a raggiungimento di un'assenza di allerta (caso 1).

Nel caso 4 il livello di allerta è massimo e dovranno essere informati anche gli organi competenti. Sarà necessario la messa a punto/rimodulazione di misure di riduzione del rischio adeguate, e mettere in atto tutte le azioni previste per il caso 2-3.

Per quanto riguarda i criteri di valutazione dei risultati dei saggi ecotossicologici possono variare in relazione alle tipologie di test applicati, ogni test standardizzato ha un suo criterio di valutazione che si applica anche attraverso l'uso di specifici software statistici.

Per la valutazione del risultato dei sedimenti marini, il DM 173/2016 prevede l'utilizzo di un software specifico che effettua una valutazione ponderata tra i tre test ecotossicologici utilizzati (vedi allegato al capitolo 3). In generale per i saggi *in vivo* (es. invertebrati, alghe, embrioni di pesce) è possibile applicare un approccio tabellare valutando il risultato di ogni singolo test rispetto alla percentuale, ad esempio, di organismi per il quale sono stati evidenziati effetti (es. EC, *Effect Concentrations* 20-30-50%); se si evidenziano percentuali di letalità superiori, questi sono indicatori di effetti importanti. L'approccio tabellare è inserito nei criteri di valutazione degli scarichi in acque superficiali nell'ambito del DL.vo 152/2006.

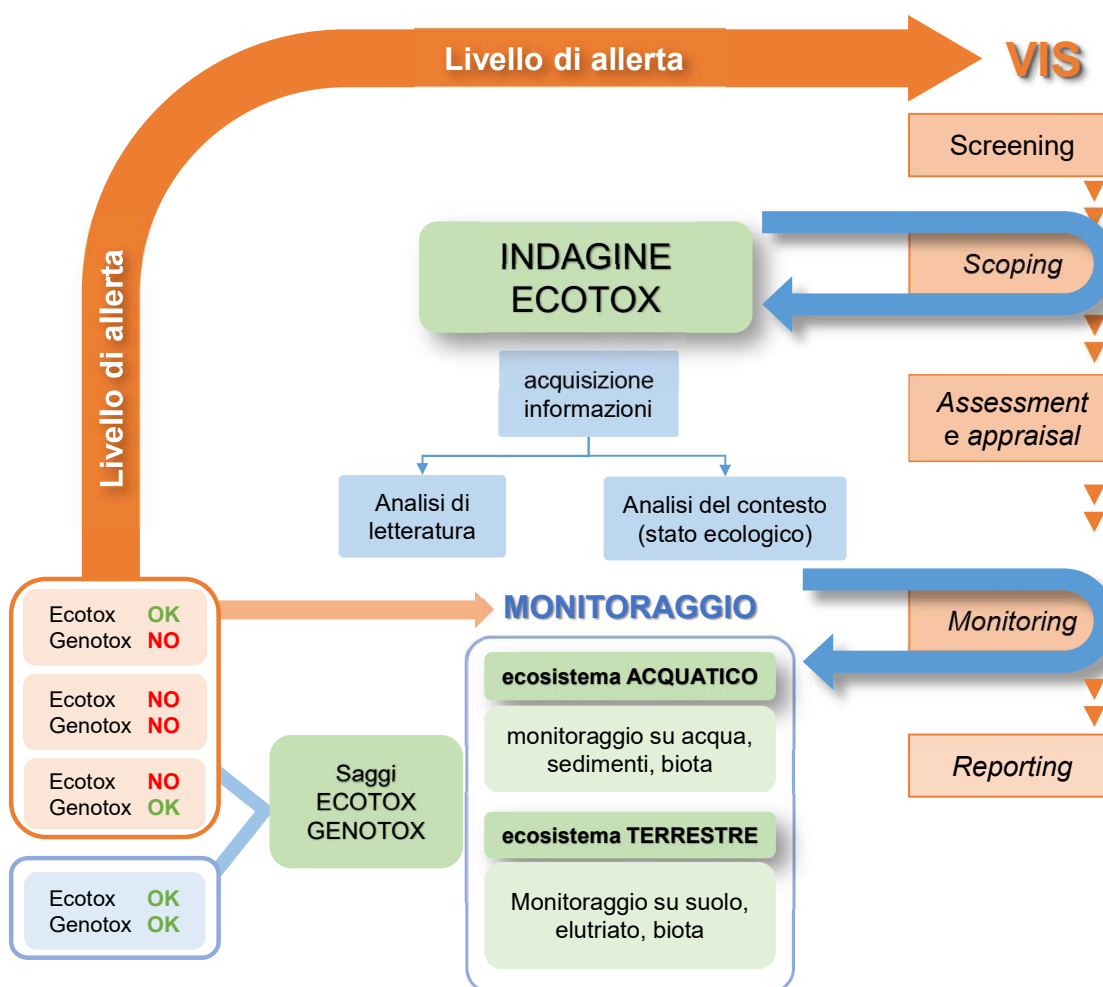


Figura 3.1. Processo logico e applicazione della valutazione ecotossicologica nell'ambito VIS
(da Rapporto ISTISAN 19/9)

Per quanto riguarda alcuni tipi di effetti estremamente rilevanti come ad esempio quelli di ecogenotossicità il criterio di valutazione si basa spesso sulla presenza/assenza di un effetto genotossico che si rileva ad esempio attraverso la presenza di micronuclei in un campione ambientale, in altri casi si usano specifici software statistici per valutare ad esempio la percentuale di danno al DNA nell'ambito del test della cometa, utilizzando controlli negativi o positivi e valutando lo scostamento rispetto ai controlli.

3.8. Considerazioni finali

La valutazione ecotossicologica rappresenta uno strumento importante per approfondire la conoscenza e il collegamento tra salute degli ecosistemi e salute umana. Nella VIS, i saggi ecotossicologici possono e devono essere utilizzati in combinazione con altri strumenti di monitoraggio ambientale (es. analisi chimiche) per avere una risposta rapida sull'eventuale tossicità di un campione ambientale, ma anche per avere delle informazioni preliminari per indirizzare le analisi chimiche successive e attuare le adeguate misure gestionali (Carere *et al.*, 2021). Inoltre, attraverso l'uso di test ecotossicologici è possibile evidenziare la biodisponibilità di un contaminante per gli organismi e avere un quadro completo della tossicità di un ecosistema, mettendo quindi in evidenza gli effetti derivati dalla presenza di miscele (Escher *et al.*, 2020). Attualmente la valutazione ecotossicologica è stata applicata in più di 20 VIS che sono state elaborate dai proponenti in tutto il territorio nazionale. Tra le tipologie di impianti rientrano anche i rigassificatori, che possono prevedere anche la presenza di installazioni marine off-shore e la costruzione di metanodotti a terra (es. Ravenna, Piombino); anche per la costruzione di tali impianti si ritiene quindi necessaria nell'ambito della VIS la valutazione ecotossicologica in quanto rappresenta una ulteriore potenziale misura e garanzia a tutela dell'ambiente e indirettamente della salute umana.

Bibliografia

- Atzei A, Jense I, Zwart EP, Legradi J, Venhuis BJ, van der Ven LTM, *et al.* Developmental neurotoxicity of environmentally relevant pharmaceuticals and mixtures thereof in a zebrafish embryo behavioural test. *Int Journ Environ Res Pub Health* 2021;18(13):6717. <https://doi.org/10.3390/ijerph18136717>.
- Babic S, Barisic J, Visic H, Sauerborn Klobucar R, Popovic Topic N, Strunjak-Perovic I, Coz-Rakovac R, Klobucar G. Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Research* 2017;115:9-21.
- Brack W, Aissa SA, Backhaus T, Dulio V, Escher BI, Faust M. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environ Sci Eu* 2019;31(10). <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2>.
- Brack W, Altenburger R, Schüürmann G, Krauss M, López Herráez D, van Gils J, *et al.* The SOLUTIONS project: challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Sci Total Environ.* 2015;503-504:22-31. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.143.
- Brack W, Escher BI, Müller E, Schmitt-Jansen M, Schulze T, *et al.* Towards a holistic and solution-oriented monitoring of chemical status of European water bodies: how to support the EU strategy for a non-toxic environment? *Environ Sci Eu* 2018;30(33). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0161-1>.
- Brinkmann T, Giner Santonja G, Yükseler H, Roudier S, Delgado Sancho L. *Best Available Techniques (BAT) Reference Document for Common Waste Water and Waste Gas Treatment/Management Systems*

- in the Chemical Sector*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2016. (EUR 28112 EN). doi:10.2791/37535
- Carere M, Antoccia A, Buschini A, Frenzilli G, Marcon F, Andreoli C, *et al*. An integrated approach for chemical water quality assessment of an urban river stretch through Effect-Based Methods and emerging pollutants analysis with a focus on genotoxicity. *Journ Environ Manag* 2021;300:113549. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113549>.
- Chapman PM. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Poll Bull* 2002;44(1),7-15. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00253-3).
- Crawford SE, Brinkmann M, Ouellet JD, Lehmkuhl F, Reicherter K, Schwarzbauer J, *et al*. Remobilization of pollutants during extreme flood events poses severe risks to human and environmental health. *J Hazard Mater* 2022;421:126691. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126691.
- Escher BI, Stapleton HM, Schymanski E. Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science* 2020;367(6476):388-92. <https://doi.org/10.1126/science.aay6636>.
- Goshua A, Gomez J, Erny B, Burke M, Luby S, Sokolow S, LaBeaud AD, Auerbach P, Gisondi MA, Nadeau K. Addressing climate change and its effects on human health: a call to action for medical schools. *Acad Med* 2021;96(3):324-328. DOI: 10.1097/ACM.0000000000003861.
- ISO 17244:2015. *Water quality — Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster (Crassostrea gigas) and mussel (Mytilus edulis or Mytilus galloprovincialis)*. Geneva: ISO; 2015.
- ISPRA. *Aspetti metodologici finalizzati all'applicazione dei saggi biologici previsti dall'allegato tecnico al D.M.173/16: Protocollo per la preparazione dell'elutriato*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2021. (Quaderni- Ricerca Marina 16/2021)
- Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, *et al* The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 2018;391(10119):462-512. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32345-0.
- Lowe D, Ebi KL, Forsberg B. Heatwave early warning systems and adaptation advice to reduce human health consequences of heatwaves. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(12):4623-48. DOI: 10.3390/ijerph8124623.
- Mancini L, Zapponi G.A. Section I Health and ecotoxicology. Preface. *Ann Ist Super Sanità* 2002;38(2),109-110.
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Decreto 15 luglio 2016, n. 173. - Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini. *Gazzetta Ufficiale* Supplemento ordinario n. 40/L, sezione generale n.208 del 6 settembre 2016
- Mushtaq N, Singh DV, Bhat RA, *et al*. Fresh Water pollution dynamics and remediation. In: Qadri H, Bhat R, *et al*. (Ed.). *Freshwater contamination: sources and hazards to aquatic biota*. Singapore: Springer; 2019. p. 27-50. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8277-2_3.
- Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiern LA, Walcott KC, *et al*. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. 2009. *Environ Intern* 2009;35(6):971-86. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. Paris: OECD Publishing; 2013. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.
- Portier CJ, Tart KT, Carter SR, Dilworth CH, Grambsch AE, Gohlke J, *et al*. A human health perspective on climate change: a Report outlining the research needs on the human health effects of climate change. *Journ Current Issues Globalization* 2010;6(4):621-710.

- Sala S, Goralczyk M. Chemical footprint: A methodological framework for bridging life cycle assessment and planetary boundaries for chemical pollution. *Integr Environ Assess Manag* 2013;9(4):623-32. DOI: 10.1002/ieam.1471. PMID: 23907984.
- UN United Nations, Transforming our world:the 2030 Agenda for Sustainable Development, A/RES/70/1, 2015 sustainabledevelopment.un.org
- UNI Ente Italiano di Normazione EN ISO 10253:2017 - Qualità dell'acqua - Saggio di inibizione della crescita delle alghe marine *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornutum*, Milano
- United Nations (UN) Department of Economic and Social Affairs (UNDESA) Division for Sustainable Development Goals (DSDG). Transforming our world: the 2030 Agenda for sustainable development, 2015.
- Wernersson A, Carere M, Maggi C, Tusil P, Soldan P, James A, *et al.* The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ Sci Eu* 2015;27 (7). Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0039-4>.

ALLEGATO al Capitolo 3**Schede tecniche (alcuni esempi)****Test alghe-marino costiero *in vivo/in vitro***

Endpoint	Inibizione della crescita algale
Specie	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Durata del test	72 h (UNI EN ISO 10253)
Rilevamento di inquinanti e miscele	Sostanza di riferimento: bicromato di potassio
Sensibilità	EC50 72 h bicromato di potassio: 20.1 mg/L
Meccanismi d'azione rilevati	Interferenza nel processo di crescita
Matrici ambientali	Elutriato di sedimento
Preparazione del campione	Salvo specifiche indicazioni del protocollo adottato, è ottenibile mediante energica agitazione per un'ora, possibilmente a temperatura ambiente, di una specifica aliquota di sedimento umido tal quale diluito con acqua di diluizione (preparata secondo lo specifico protocollo metodologico del saggio biologico) in rapporto 1:4 (peso secco/ volume acqua). Tale campione sarà successivamente centrifugato e il surnatante, secondo il protocollo adottato, utilizzato per il saggio (ISPRA – Quaderno 16/2021 - Aspetti metodologici finalizzati all'applicazione dei saggi biologici previsti dall'allegato tecnico al DM 173/2016: Protocollo per la preparazione dell'elutriato)
Conservazione del campione	Preparazione elutriato: entro 10 gg dal campionamento; analisi entro 24 h dalla preparazione dell'elutriato oppure congelamento del campione fino all'analisi (generalmente al massimo 2 mesi). Il campione va conservato in refrigerazione fino alla preparazione dell'elutriato.
Costi	Medio
Normativa di riferimento	UNI EN ISO 10253:2017 - Qualità dell'acqua - Saggio di inibizione della crescita delle alghe marine <i>Skeletonema costatum</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>

Test embrioni ostrica *in vivo/in vitro*

Endpoint	Anomalie nello sviluppo embrio-larvale
Specie	<i>Crassostrea gigas</i>
Durata del test	24 h
Rilevamento di inquinanti e miscele	Sostanza di riferimento: Rame solfato eptaidrato
Sensibilità	EC50 24 h Rame: 4-16 µg/L (ISO 17244:2015)
Meccanismi d'azione rilevati	Interferenza nel processo di sviluppo embrionale
Matrici ambientali	Elutriato di sedimento
Preparazione del campione	Salvo specifiche indicazioni del protocollo adottato, è ottenibile mediante energica agitazione per un'ora, possibilmente a temperatura ambiente, di una specifica aliquota di sedimento umido tal quale diluito con acqua di diluizione (preparata secondo lo specifico protocollo metodologico del saggio biologico) in rapporto 1:10 (peso secco/ volume acqua). Tale campione sarà successivamente centrifugato e il surnatante, secondo il protocollo adottato, utilizzato per il saggio (ISPRA – Quaderno 16/2021 - Aspetti metodologici finalizzati all'applicazione dei saggi biologici previsti dall'allegato tecnico al DM 173/2016: Protocollo per la preparazione dell'elutriato)
Conservazione del campione	Preparazione elutriato: entro 10 gg dal campionamento; analisi entro 24 h dalla preparazione dell'elutriato oppure congelamento del campione fino all'analisi (generalmente al massimo 2 mesi). Il campione va conservato in refrigerazione fino alla preparazione dell'elutriato.
Costi	Medio
Normativa di riferimento	ISO 17244:2015 Water quality — Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) and mussel (<i>Mytilus edulis</i> or <i>Mytilus galloprovincialis</i>)

Test della cometa *in vivo*

Endpoint	Danno al DNA
Specie	Organismi acquatici e terrestri (piante e animali)
Durate del test	24-48 h
Rilevamento di inquinanti e miscele	Qualsiasi
Sensibilità	Molto elevata
Meccanismi d'azione rilevati	Rotture del singolo o del doppio filamento del DNA, danno agli intermedi dei processi di riparazione
Matrici ambientali	Qualsiasi
Preparazione del campione	Necessità di estrazione del campione e concentrazione su colonna
Conservazione del campione	Temperatura variabile a seconda della matrice e/o delle caratteristiche intrinseche del campione
Costi	Medio
Normativa di riferimento	OECD TG 489

Test *Fish Embryo Toxicity*

Cosa è analizzato	4 osservazioni apicali vengono registrate giornalmente e sono indicatori di letalità: coagulazione di uova fertilizzate, mancanza di formazione di somiti, mancanza del distacco della coda dal sacco vitellino, mancanza di battito cardiaco. La tossicità acuta si basa sulla frequenza di ciascuno di questi indicatori e si effettua tramite la LC ₅₀
Tessuti esaminati	Embrioni completi, somiti, coda, battito cardiaco
Metodo utilizzato	OECD guideline 236 FET test. Si può effettuare il test con esposizione delle piastre a 96 ore. Si possono utilizzare anche piastre a 96 pozzetti.
Quantità di campione necessaria	Circa 180 embrioni per il test principale (20 embrioni per la concentrazione del test e per il controllo: diluente, solvente, controlli positivi e negativi). Quando si svolge un "range finding test" 10 embrioni per concentrazione sono raccomandati.
Possibilità di conservare i campioni	Non per i test acuti. Alla fine del test gli embrioni possono essere congelati, anche in azoto liquido a -20 o -80°C (per più lunghi periodi) al fine di effettuare altri test (es. Acetilcolinesterasi).
Possibilità per uso in ambiente marino	Zebrafish è una specie di acqua dolce. Però il metodo può essere utilizzato anche in acque marine o estuarine. Un metodo per i sedimenti è stato sviluppato e validato (Hollert <i>et al.</i> , 2003; Höss <i>et al.</i> , 2009)
Quando iniziare il test	Il test va iniziato il prima possibile appena le uova sono fertilizzate
Tempi di risposta	96 ore
Costi	I costi sono notevolmente più bassi rispetto ad analisi chimiche. Possono aumentare in caso di ulteriori test.