

Ai miei genitori

Indice

1 - Introduzione

1.1 - Ritardanti di fiamma bromurati (BFR)

1.2 - I Polibromodifenileteri (PBDE)

1.2.1 - Proprietà chimico-fisiche

1.3 - I PBDE come POP emergenti

1.3.1 - Caratteristiche dei POP

1.3.2 - Legislazione

1.4 - Scopo della tesi

2 - Presenza di PBDE in zone ad elevato grado di antropizzazione

2.1 - Studio di una delle principali sorgenti di PBDE: gli impianti di depurazione liquami

2.1.1 - Descrizione di un generico impianto di depurazione a fanghi attivi

2.1.2 - Gli impianti in esame

2.1.3 - Campionamento e trattamento dei campioni

2.1.4 - Risultati

2.2 - Test ELISA: un nuovo metodo analitico per la rilevazione di PBDE nei fanghi

2.2.1 - Cenni sulla reazione antigene-anticorpo

2.2.2 - Campionamento e trattamento dei campioni

2.2.3 - Procedura per il Test ELISA

2.2.4 - Risultati

2.3 - Contaminazione delle zone limitrofe ad un impianto di depurazione liquami

2.3.1 - Campionamento e trattamento dei campioni

2.3.2. - Risultati

*2.3.3 - PBDE nell'atmosfera interna e esterna all'impianto di depurazione
acque reflue di Baciacavallo (Prato)*

*2.3.4 - PBDE nell'atmosfera interna ed esterna all'impianto di depurazione
acque reflue di Calice (Agliaiana, PT)*

2.4 - Biomonitoraggio ambientale: *Talitrus saltator* come nuovi biomonitor per PBDE

2.4.1 - L'ambiente costiero

2.4.2 - Gli anfipodi talitridi

2.4.3 - Campionamento e trattamento dei campioni

2.4.4 - Risultati

3 - Presenza di PBDE in zone a basso grado di antropizzazione

3.1 - Presenza di PBDE in Artico: studio delle matrici neve e aria

3.1.1 - Campionamento

3.1.2 - Trattamento campioni

3.1.3 - Risultati

3.2 - Presenza di PBDE in Antartide: studio di matrici biota (Foca di Weddell)

3.2.1 - La catena trofica antartica

3.2.2 - La foca di Weddell

3.3.3 - Campionamento e trattamento dei campioni

3.3.4 - Risultati

1 - Introduzione

1.1 - Ritardanti di fiamma bromurati (BFR)

I ritardanti di fiamma sono sostanze chimiche impiegate nei materiali plastici, tessili, nei circuiti elettronici e in molti altri prodotti, allo scopo di incrementarne le caratteristiche ignifughe e quindi evitare, o ritardare, l'estendersi e il propagarsi delle fiamme. Esistono diversi tipi di ritardanti di fiamma, generalmente divisi in classi: composti organici contenenti alogeni, fosforo o azoto, e composti inorganici. I ritardanti di fiamma bromurati, BFR (Brominated Flame Retardants), sono una delle classi utilizzate maggiormente a questo scopo. La stima del consumo globale mostra il loro continuo incremento: nel decennio tra il 1990 e il 2000 il loro utilizzo è raddoppiato passando da 145 a 310 kilotonnellate (Arlas, 2001; Eljarrat et al., 2005). La famiglia dei BFR comprende oltre 75 diversi congeneri commercialmente riconosciuti e i principali ritardanti di fiamma utilizzati sono il tetrabromobisfenolo A (TBBPA), l'esabromociclododecano (HBCD) e le tre miscele commerciali di polibromodifenileteri (PBDE), note come Decabromodifenileteri (Deca-BDE), Octabromodifenileteri (Octa-DBE) e Pentabromodifenileteri (Penta-BDE). Secondo quanto emerso da un'indagine condotta dall'USEPA Project Plan nel Marzo 2006, sono 600000 le tonnellate di ritardanti di fiamma prodotti annualmente, di cui 150000 sono bromurati e un terzo di questi contiene PBDE.

I ritardanti di fiamma agiscono in fase vapore e proprio grazie a questa loro particolarità è legata la scelta del sostituito alogenato di utilizzo; infatti mentre il cloro e il bromo sono entrambi efficienti in questo ruolo, il fluoro è troppo stabile per svolgere questa funzione ed i composti a base di iodio sono, invece, troppo instabili. I ritardanti di fiamma clorurati sono usati principalmente nelle plastiche in quanto garantiscono una buona stabilità alla luce ma, se comparati ai BFR, per ottenere un risultato analogo ne deve essere utilizzato un quantitativo maggiore. Questo comportamento è dovuto al più facile rilascio di radicali liberi bromo in virtù del più debole legame bromo-carbonio rispetto a quello cloro-carbonio. In caso di incendio, infatti, l'energia termica rilasciata durante la combustione è sufficiente per la formazione dei radicali bromo che, andando a sopprimere la cascata di radicali carbonio prodotti nel processo, permettono una diminuzione delle fiamme e, contemporaneamente, riducono il calore e il monossido di carbonio originati. (Hooper et al., 2000; Szymanska J.A., 1996).

In figura 1.1.1 viene messo a confronto il comportamento di prodotti non additivati e additivati con ritardanti di fiamma bromurati, nel caso specifico PBDE, durante il processo di combustione: mentre i prodotti non additivati con ritardanti di fiamma subiscono il processo di

combustione totale in breve tempo, quelli additivati resistono per un periodo superiore garantendo, in caso di incendio, un tempo di fuga 15 volte superiore (BSEF: Fact Sheet: Brominated Flame Retardant Deca-BDE, 2007) (http://www.bsef.com/publications/BSEF_Factsheet_Deca-BDE.pdf).



Figura 1.1.1 - Comportamento di sostanze non additate e additate con ritardanti di fiamma durante la combustione

I BFR si suddividono in due grandi categorie a secondo del modo in cui vengono incorporati nel polimero: i composti reattivi (come, ad esempio, il TBBPA), che si legano chimicamente alle plastiche, e quelli additivi (PBDE e HBCDD) che sono, invece, semplicemente miscelati al prodotto.

I composti additivi sono spesso semplicemente aggiunti ai prodotti, per cui sono mobili all'interno di questi stessi e tendono ad essere rilasciati sia in fase di produzione che di uso e smaltimento.

1.2 - I Polibromodifenileteri (PBDE)

I PBDE, la cui struttura è riportata in figura 1.2.1, vengono impiegati nei polimeri (plastiche, gomme e resine), in apparecchiature elettroniche ed elettriche (televisori, computer, forni a microonde), negli arredi (schiume poliuretaniche), in tappeti ed imbottiture, negli interni di automobili ed aerei, in materiali tessili (*de Boer et al., 1999*).

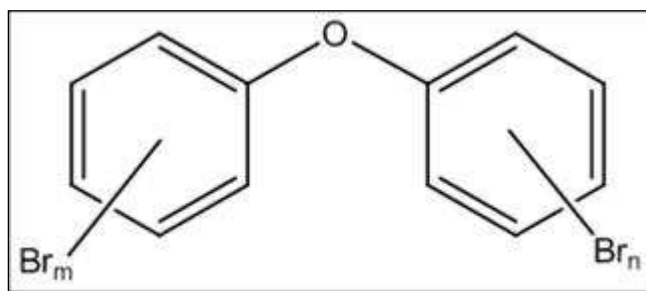


Figura 1.2.1 - Struttura generica dei PBDE

Fin dagli anni '60 i PBDE sono stati aggiunti come ritardanti di fiamma in materiali polimerici termoplastici e grazie al loro ampio utilizzo la domanda globale di PBDE è cresciuta rapidamente dagli anni '70 fino ai giorni nostri: nel 1992 la produzione globale si aggirava intorno alle 40.000 tonnellate mentre nel 2001, ha raggiunto, approssimativamente, le 67.000 tonnellate (BSEF, 2006).

I PBDE utilizzati a livello commerciale sono ottenuti mediante bromurazione di difenileteri in presenza di catalizzatori di Friedel-Craft (ad es. $AlCl_3$) utilizzando come solvente, ad esempio, dibromoetano per ottenere la formazione di una miscela di difenileteri contenente diverse tipologie di congeneri.

A seconda del numero di sostituenti bromo presenti sulla struttura si possono ottenere, infatti, 209 diversi congeneri; di questi meno di quaranta sono stati sintetizzati come conseguenza della scarsa stabilità, molti congeneri hanno forte tendenza a debromurare. La mancanza di congeneri puri è uno dei maggiori impedimenti alle analisi chimiche per la determinazione delle loro proprietà chimico-fisiche (Palm A. et al., 2002). I congeneri stabili dei PBDE presenti nei prodotti contenenti i ritardanti di fiamma sono in percentuali che possono variare dal 5% al 30% (WHO. Brominated Diphenyl Ethers. IPCS Environmental Health Criteria 162. Geneva:World Health Organization,1994.)

Nella tabella 1.2.1 sono riportati i 209 congeneri dei PBDE e la loro nomenclatura IUPAC che, come si può notare, è molto simile a quella assegnata ai PCB .

Formula molecolare	Nome bromodifeniletere	Numero isomeri	IUPAC n°
$C_{12}H_9 BrO$	mono	3	1-3
$C_{12}H_8 Br_2O$	di	12	4-15
$C_{12}H_7 Br_3O$	tri	24	16-39
$C_{12}H_6 Br_4O$	tetra	42	40-81
$C_{12}H_5 Br_5O$	penta	46	82-127
$C_{12}H_4 Br_6O$	esa	42	128-169
$C_{12}H_3 Br_7O$	epta	24	170-193
$C_{12}H_2 Br_8O$	octa	12	194-205
$C_{12}H_1 Br_9O$	nona	3	206-208
$C_{12}Br_{10}O$	deca	1	209

Tabella 1.2.1 - I 209 congenere di PBDE

Le tre miscele commerciali si differenziano per il grado di bromurazione dei congeneri presenti come di seguito riportato:

Miscela Penta-BDE: costituita da tetrabromodifenileteri (24-38%), pentabromodifenileteri (56-60%) ed esabromodifenileteri (4-8%). I congeneri più abbondanti in queste miscele sono il tetra-BDE 2,2',4,4' (BDE-47), i penta-BDE 2,2',4,4',5 (BDE-99) e 2,2',4,4',6 (BDE-100) e gli esa-BDE 2,2',4,4',5,5' (BDE-153) e 2,2',4,4',5,6' (BDE-154). Il BDE-47 e il BDE-99 corrispondono da soli a circa il 75% della massa totale. Si presentano come dei liquidi viscosi e sono utilizzati soprattutto nelle stoffe e nelle schiume poliuretatiche, ma sono presenti anche nelle resine.

Miscela Octa-BDE: è una miscela costituita da esabromodifenileteri (10-12%), eptabromodifenileteri (44%), octabromodifenileteri (31-35%), nonabromodifenileteri (10-11%) e decabromodifeniletere (<1%). I congeneri più abbondanti sono l'epta-BDE 2,2',3,4,4',5',6 (BDE-183) e l'esa-BDE 2,2',4,4',5,5' (BDE-153). Si presentano come polveri bianche e si ritrovano principalmente in prodotti più piccoli quali apparecchiature elettriche o elettroniche (computer, calcolatrici, ecc.).

Miscela Deca-BDE: costituita da nonabromodifenileteri (< 3%) e dal decabromodifeniletere (BDE-209) (> 97%); è una polvere bianca che si ritrova soprattutto in apparecchi elettrici ed elettronici, ma anche nelle stoffe (Birnbaum L.S. et al., 2004), (Alaee M. et al., 2003).

Tra queste la più importante in termini di produzione globale è la miscela Deca-BDE, che rappresenta attualmente l'80% del mercato globale dei PBDE, questo maggior utilizzo è dovuto alla messa al bando della miscela Penta-BDE, formalizzata nel luglio 2003, seguita poi da una restrizione all'uso del Penta-BDE e della Octa-BDE nei dispositivi elettrici e elettronici dal 1 luglio 2006 (Birnbaum e Staskal, 2004).

Sebbene nella formulazione originale il BDE-209 risulti meno tossico rispetto ai congeneri contenuti nelle miscele Penta- e Octa-BDE, la sua pericolosità non è, comunque, da sottovalutare, infatti, sempre più evidenze scientifiche dimostrano la sua capacità di degradarsi, nell'ambiente, in furani e forme chimiche tossiche, come i congeneri inferiori costituenti le miscele Penta-BDE e Octa-BDE (Birnbaum e Staskal, 2004).

1.2.1 - Proprietà chimico-fisiche

La conoscenza delle proprietà chimico-fisiche dei PBDE è di fondamentale importanza per spiegare la ripartizione dei congeneri nelle varie matrici ambientali e la possibilità di trasporto a lunga distanza. Qui di seguito sono presi in considerazione i parametri chimico-fisici più importanti:

- **Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}):** i valori di K_{ow} rappresentano la tendenza di un composto organico a ripartirsi tra una fase organica (sia essa di origine ambientale o biologica) ed una fase acquosa, misurandone dunque la lipofilità. Composti organici con bassi valori di K_{ow} (< 10) sono considerati idrofilici e tendono ad avere alta solubilità in acqua, basso coefficiente di adsorbimento nel suolo/sedimento e bassi valori dei fattori di bioconcentrazione; al contrario composti aventi alti valori di K_{ow} ($>10^4$) sono molto idrofobici ed hanno caratteristiche opposte.

I PBDE hanno valori di $\log K_{ow}$ che variano da 5,9 a 6,2 per i tetra-BDE e da 6,6 a 7,0 per i penta-BDE che pertanto sono molto idrofobici (Rahman F. et al., 2001). I congeneri a più elevato grado di bromurazione presentano caratteristiche ancora più idrofobiche (per gli octa-BDE il $\log K_{ow}$ varia da 8,4 a 8,9 mentre per il deca-BDE si ha un valore stimato pari a 12,61) (Hardy M.L., 2002) e sperimentale di 10 (Darnerud P.O. et al., 2001).

- **Coefficiente di ripartizione carbonio organico/acqua (K_{oc}):** correlato a K_{ow} , misura la tendenza di un composto organico a ripartirsi fra il carbonio organico presente nel suolo/sedimenti e l'acqua, e quindi la sua tendenza ad essere adsorbito. Il K_{oc} è una caratteristica specifica della sostanza ed è indipendente dalle caratteristiche del suolo, il suo valore, inoltre, è utile per predire la mobilità dei contaminanti organici in esso: più il suo valore è alto, più è bassa la mobilità del composto chimico.

I PBDE hanno valori elevati di K_{oc} che crescono con l'aumentare del numero di atomi di bromo sostituiti fino a raggiungere, per la miscela Deca-BDE, un valore di $1,8 \times 10^6$. Tali valori indicano un'alta probabilità di adsorbimento dei PBDE su carbonio organico senza che avvenga una conseguente volatilizzazione dal suolo o dai sedimenti.

- **Pressione di vapore:** è un parametro chimico-fisico molto importante per valutare il comportamento di un composto nell'atmosfera. I PBDE presentano bassi valori di pressione di vapore, la quale è inversamente correlata con il numero di atomi di bromo presenti in un composto. Si ritiene che i composti a maggior livello di bromurazione siano per lo più presenti sotto forma di particolato piuttosto che in fase di vapore.
- **Temperatura di ebollizione:** le temperature di ebollizione oscillano tra i 310 e i 425°C.
- **Solubilità in acqua:** i PBDE presentano bassa solubilità in acqua e tale proprietà diminuisce all'aumentare del grado di bromurazione della molecola. Contemporaneamente va ad aumentare il carattere lipofilo delle molecole che ne permette la solubilità in solventi apolari. Il forte carattere idrofobico conferisce ai tetra-BDE, penta-BDE e octa-BDE non solo alta solubilità nei tessuti grassi e la possibilità di legarsi alla frazione organica del particolato, ma anche una maggiore pericolosità dal punto di vista ambientale in quanto queste caratteristiche favoriscono i processi di bioaccumulo (Darnerud P.O. et al., 2001).

Il BDE-209 ha caratteristiche che si discostano da quelle degli altri PBDE dato il suo alto grado di bromurazione e la diversa configurazione tridimensionale; infatti, a differenza degli altri, non può assumere una configurazione planare. Il legame etereo, a causa della sua geometria di legame con angolo di 120° , costituisce infatti un'elevata barriera alla rotazione, impedendo così l'assunzione della conformazione complanare dei due anelli aromatici. La planarità è, inoltre, sfavorita dalla presenza nelle posizioni orto (2,2' e 6,6') dei sostituenti bromo, che danno maggiore ingombro sterico rispetto agli atomi di cloro e favoriscono, quindi, una disposizione perpendicolare dei due anelli (Hardy M. L., 2002). Essendo la planarità una delle caratteristiche che rendono PCB e diossine sostanze tossiche, composti strutturalmente molto simili ai PBDE, risulta improbabile che il deca-BDE si comporti come tali composti; mentre è proprio la similarità strutturale con queste due classi di composti che conferisce agli altri PBDE un vario grado di tossicità.

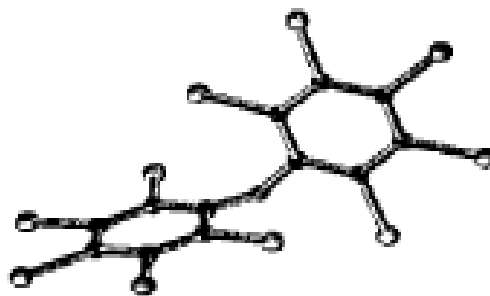


Figura 1.2.2 - Configurazione tridimensionale del BDE-209

Considerando, per il BDE-209, il peso molecolare (959,17 g/mol), il valore della K_{ow} , la solubilità in acqua (<0,1 µg/l), i valori di K_{oc} e di pressione di vapore, si può supporre che sia molto meno mobile rispetto agli altri PBDE e che abbia alta probabilità di adsorbimento su carbonio organico senza che avvenga una conseguente volatilizzazione dal suolo o dai sedimenti. Basandosi, inoltre, sulle sue caratteristiche chimico-fisiche è stato ideato un modello di ripartizione ambientale del deca-BDE secondo cui esso si trova legato per il 57% ai sedimenti, per il 42% al suolo, l'1,0% in acqua e 0,1% in aria (BSEF, 2005).

Dunque la sua presenza in acqua, dove tende ad adsorbirsi principalmente sul particolato disciolto, è solo a livello di tracce mentre, per la maggior parte, lo si trova legato sul carbonio organico di suoli e sedimenti senza che volatilizzi in modo significativo verso l'atmosfera.

1.3 - I PBDE come POP emergenti

1.3.1 - Caratteristiche dei POP

Date le loro caratteristiche chimico-fisiche i PBDE possono essere inseriti tra gli inquinanti organici persistenti (POP) considerati, tra i composti organici di sintesi, i più pericolosi per l'ambiente e la salute pubblica. I POP sono infatti caratterizzati da elevata tossicità, persistenza, bioaccumulo e trasporto a lungo raggio, tra questi vi sono pesticidi, prodotti industriali, diossine e furani.

- **Persistenza:** questa proprietà è generalmente collegata alla stabilità di questi composti, i quali sono altamente resistenti alla degradazione biologica, chimica e fotolitica. Questa caratteristica, che rende i POP persistenti nell'ambiente per periodi lunghi è connessa ad alcune caratteristiche strutturali della molecola, come la presenza di sistemi aromatici e la sostituzione di uno o più atomi di idrogeno del sistema aromatico, con uno o più alogeni. Il legame carbonio-alogeno è,

infatti, molto stabile e resistente all'idrolisi; ne consegue che più alto è il numero di atomi di alogeno nella struttura e maggiore è la resistenza alla degradazione biologica.

Se dal punto di vista tecnico-commerciale questa caratteristica è ricercata affinché le sostanze aggiunte nei prodotti mantengano la loro efficacia, dall'altra parte la stabilità di queste sostanze e la loro resistenza alla degradazione fa sì che permangano a lungo nell'ambiente. I PBDE sono considerati persistenti nell'ambiente in virtù della loro resistenza alla degradazione da parte di acidi, basi, agenti ossidanti e/o riducenti (Rahman et al., 2001). Anche se sia la produzione che l'utilizzo delle miscele commerciali di Penta-BDE e Octa-BDE sono state vietate, un largo numero di prodotti ancora in uso contiene tali ritardanti di fiamma; questo significa che il loro rilascio nell'ambiente continuerà, attraverso il ciclo di vita dei prodotti che li contengono, potenzialmente ancora per molti anni.

Alcuni studi volti a monitorare la debolezza fotolitica dei singoli congeneri presenti nelle miscele commerciali, hanno rilevato che subiscono debromurazione in presenza di luce ultravioletta. (Eriksson et al., 2001) (Olsman et al., 2002.). Eriksson et al. (2001) hanno verificato come la velocità di reazione della fotodecomposizione dipenda dal grado di bromurazione del congenero: più questo è basso, più è lenta la reazione; gli octa-BDE e il deca-BDE decompongono invece più rapidamente. Il tempo di emivita del BDE-209 esposto a processo fotolitico dipende dalla matrice su cui è adsorbito, ad esempio in toluene o su silica gel è inferiore rispetto alle matrici naturali: nei primi due è di circa 15 min mentre nei sedimenti si aggira intorno alle 53 h e nei terreni sulle 150-200 h.

- **Bioaccumulo:** la capacità di una sostanze di bioaccumulare dipende dalla sua solubilità nei lipidi. I POP sono sostanze altamente lipofile e poco solubili in acqua, proprietà che è comunemente evidenziata dagli alti valori del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (K_{ow}). I composti alogenati risultano, infatti, più solubili nei lipidi e meno solubili in acqua dei corrispondenti composti non alogenati; ciò accresce la tendenza di queste sostanze a concentrarsi nei tessuti ricchi di grassi degli organismi viventi.

Come conseguenza della bioaccumulazione, i POP danno luogo al processo di biomagnificazione, cioè all'aumento della concentrazione negli organismi che si trovano ai livelli più alti della catena trofica (R. Miniero and A. L. Iamicelli, 2008).

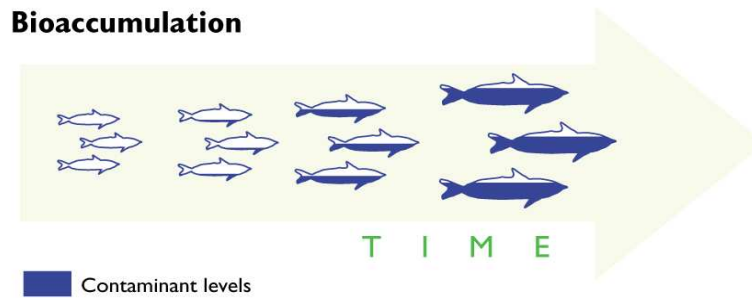


Figura 1.3.1 - Esempio del fenomeno della bioaccumulazione

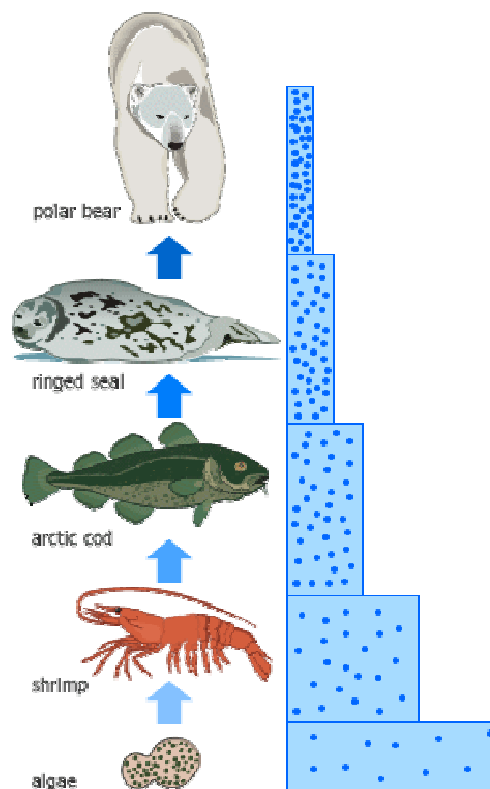


Figura 1.3.2 - Esempio del fenomeno della biomagnificazione

- **Tossicità:** i POP sono sostanze che per inalazione, ingestione o contatto cutaneo possono comportare effetti acuti o cronici gravi per la salute fino a causare, talora, la morte dell'organismo. La tossicità dei PBDE non è ancora ben compresa ma è dato certo che non tutti i congeneri siano tossici, o non lo siano nella stessa misura. Il confronto tra i dati di esposizione e la quantificazione della tossicità dei singoli contaminanti delle miscele sono stati, e sono

tuttora, oggetto di studio. La diversa tossicità del deca-BDE rispetto agli altri congeneri può essere già ipotizzata guardando la sua struttura della molecola, essendo completamente sostituita questa è grande e ingombrante, caratteristiche responsabili delle difficoltà nel passaggio attraverso le membrane cellulari. La permanenza del deca-BDE nel corpo in seguito all'assorbimento è breve in molti animali: nell'arco di 24-72 h ne viene eliminato più del 99% (NTP, 1986) (el Dareer et al., 1987). Inoltre, il processo di rimozione per via enzimatica di uno o più atomi di bromo è relativamente facile ed aiuta nell'espulsione dall'organismo ma anche nella formazione di prodotti di degradazione metabolica. Il meccanismo di formazione di questi sottoprodotti ed il loro destino all'interno del corpo non sono ancora chiari, ma data la possibile formazione dei congeneri più tossici, è necessario uno studio più approfondito ed un loro continuo monitoraggio.

L'interesse tossicologico riguardo l'esposizione a basse concentrazioni ambientali di PBDE è basato principalmente sulla loro potenzialità di agire come distruttori del sistema endocrino (ECD, endocrine disrupting chemicals) nonché come composti neurotossici. Il collegamento etero tra i due anelli aromatici rende i PBDE strutturalmente molto simili all'ormone tiroideo Tiroxina e per questa ragione li rende capaci di interferire con il sistema endocrino (Siddiqi M.K., 2003). I PBDE possono mimare gli ormoni sessuali estrogeni o androgeni o in alternativa bloccarne le attività. Sono inoltre considerati agenti responsabili sia di tumori al fegato, che di disfunzioni tiroidee (Darnerud et al., 2007).

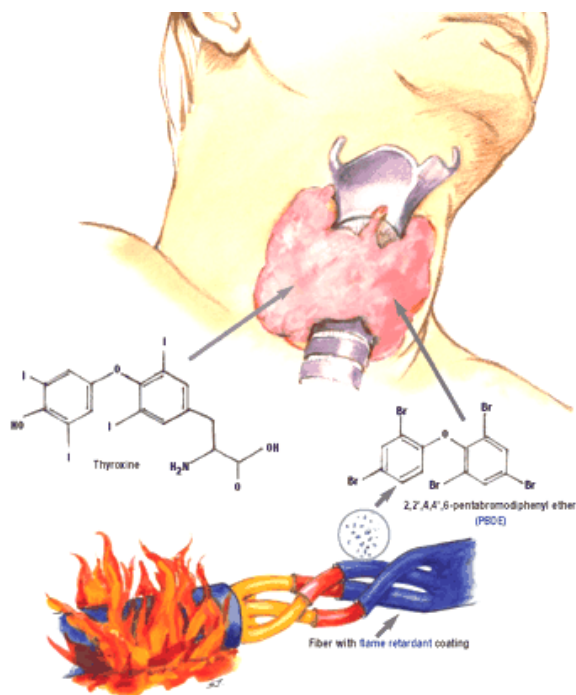


Figura 1.3.3 - Confronto tra la struttura dell'ormone tiroideo e dei PBDE

Una delle principali vie di assunzione dei PBDE, da parte dell'uomo, è l'ingestione di alimenti contaminati. In particolare il consumo di pesce, alimento ricco di grassi, è stato correlato con il quantitativo di PBDE nel latte materno (Darnerud et al., 2001). Altra modalità di assunzione, che può contribuire significativamente all'apporto totale, è l'inalazione di aria contaminata: infatti, negli ambienti domestici, tali sostanze vengono rilasciate da oggetti di consumo quali apparecchiature elettroniche, stoffe, tessuti da arredamento come tappeti e carte da parati. I PBDE si staccano, infatti, dalla plastica e dai tessuti resi ignifughi, sottoforma di particelle di polvere o di gas che aderiscono alla polvere, la quale viene inalata da adulti e bambini. È stato stimato che la media giornaliera di esposizione al PBDE nell'uomo è di 123 ng/persona (32,9 attraverso la sola via respiratoria).

In figura 1.3.4 è riportato uno schema delle principali vie di esposizione a PBDE.

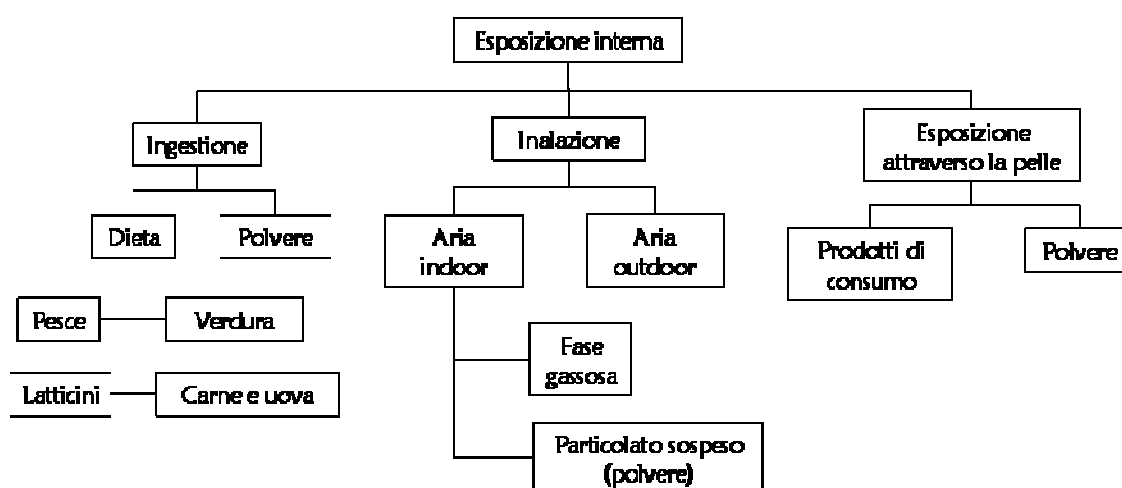


Figura 1.3.4 - Vie di esposizione basate sul modello descritto da Thomsen et al., 2006. I prodotti di consumo includono un ampio range di prodotti tra cui tappeti, mobili, etc. (Frederiksen et al., 2008).

Il profilo tossicologico è ancora incompleto ed insufficiente per garantire una valutazione adeguata del rischio, soprattutto per quanto riguarda i potenziali effetti a carico del sistema endocrino. A tutt'oggi non è noto se il quantitativo di PBDE che si riscontra nei tessuti umani sia sufficiente a causare effetti tossici, anche se la dose minima che causa effetti sull'animale è superiore alla quantità riscontrata nella dieta umana.

- **Trasporto a lungo raggio:** la presenza dei POP è stata rilevata in ogni zona del pianeta, sia nelle regioni vicine al punto di immissione nell'ambiente sia in zone molto lontane da tali sorgenti, ovvero regioni remote come per esempio l'Antartide e l'Artico. Per spiegare l'ubiquità di questi inquinanti sono stati proposti vari modelli, tra questi il più accreditato è quello di

Wania e Mackay, del 1996, chiamato “Teoria della distillazione o del frazionamento globale”, vedi figura 1.3.5.

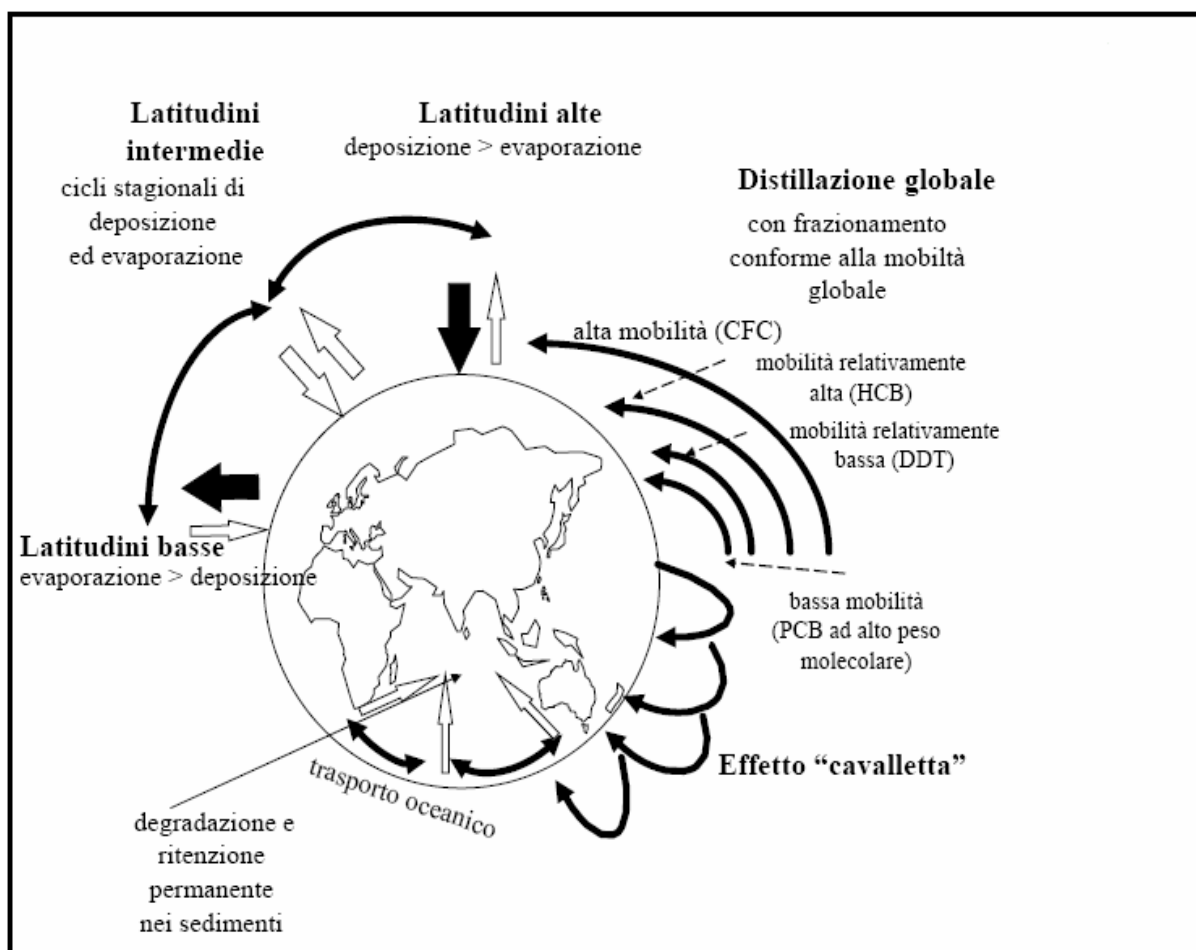


Figura 1.3.5 - Schema del modello della distillazione globale

I POP hanno caratteristiche chimico-fisiche tali per cui nelle regioni tropicali e subtropicali la temperatura favorisce la loro evaporazione dalle superfici terrestri e acquatiche, in atmosfera si spostano nelle regioni a più alte latitudini, caratterizzate da temperature più basse, dove viene favorito il loro deposito sul suolo e nell'acqua. I POP migrano alle latitudini più elevate non in un solo step, ma tramite una serie di salti chiamati anche "Effetto Grass-hopper" o "distillazione globale" (Wania et al.1996); si hanno così dei cicli successivi di migrazione e deposizione, i quali dipendono sia dalle variazioni stagionali e giornaliere che dalla temperatura, dando origine a un movimento lento e graduale. I POP più volatili tendono a rimanere nell'aria e a migrare più velocemente verso i poli mentre quelli meno volatili si ripartiscono nell'acqua, nel suolo, sulla vegetazione nelle regioni a basse latitudini dove di solito vengono rilasciati (Wania et al.1996). Durante il trasporto quindi miscele complesse tenderanno ad essere "frazionate", ossia

saranno soggette ad una separazione latitudinale in cui i composti più pesanti e meno volatili saranno depositati non lontano dalle fonti di emissione, quelli più leggeri invece tenderanno a viaggiare verso le regioni più distanti e fredde prima di ricondensare.

Il trasferimento dei POP nell'ambiente può essere paragonato ad un sistema cromatografico in cui le superfici terrestri, come il suolo e la vegetazione, rappresentano la fase stazionaria del sistema e l'atmosfera rappresenta la fase mobile. I composti volatilizzano nella fase mobile e si muovono attraverso il sistema a differenti velocità in base a come si ripartiscono e vengono ritenuti in fase stazionaria; il tempo di ritenzione tenderà a diminuire con l'aumentare della volatilità del composto.

In alternativa a questi meccanismi possono verificarsi processi di trasporto oceanico. Questa modalità risulta essere più lenta se paragonata a quella atmosferica, ma anche questo compartimento ambientale deve essere monitorato a causa del possibile deposito di inquinanti (sink). Sono, infatti, state riportate evidenze del trasporto dei PBDE nelle profondità dell'oceano (de Boer et al., 1998) ed è quindi probabile che gli oceani giochino un ruolo molto importante nel destino di questi composti.

Ci aspetteremmo un'elevata presenza di BDE-209 in questa matrice dato il suo elevato utilizzo, ed è invece rilevato solo in tracce; possiamo quindi supporre, come già nel caso del trasporto atmosferico, che il deca-BDE incorra in processi di fotodissociazione e degradazione metabolica, formando nell'ambiente marino PBDE meno bromurati.

In Asia, dove viene consumato il 42% della produzione mondiale delle miscele Deca-BDE e non è stata importata la miscela Penta-PBE (de Wit C., 2002), sono state rilevate recentemente nell'ambiente marino, concentrazioni rilevanti di tetra e penta-BDE. Un ulteriore studio di Wurl et al. (2006) effettuato nei mari di Hong Kong, sottolinea come il BDE-209 sia presente solo in tracce mentre si hanno concentrazioni rilevanti di altri congeneri tra cui il BDE-28, 47, 100 e 183. Si pensa, infatti, che la degradazione del deca-BDE, o comunque di congeneri ad alto grado di bromurazione, giochino un ruolo fondamentale nella presenza oceanica dei PBDE (Bayen S. et al., 2003) (Zheng, G.J. et al., 2004).

1.3.2 - Legislazione

I potenziali effetti negativi sull'ambiente e la salute umana per esposizione ai POP hanno preoccupato i governi, le organizzazioni ambientali non governative e la comunità scientifica. La persistenza di queste sostanze nell'ambiente e la tendenza ad essere trasportate anche a grande distanza dalle sorgenti, hanno reso necessari provvedimenti internazionali per il controllo dell'immissione di tali sostanze nell'ambiente. Un cambiamento legislativo a livello globale è avvenuto con la Convenzione di Stoccolma, approvata da 87 paesi il 23 Maggio 2001. La Convenzione di Stoccolma è stata il primo strumento legalmente vincolante con criteri basati

scientificamente per riconoscere i potenziali POP pericolosi. Successivamente (tra il 2002 ed il 2007), hanno ratificato la convenzione di Stoccolma altri paesi fino ad arrivare, allo stato attuale, ad un totale di 152 paesi firmatari. Tale trattato si proponeva come obiettivo principale l'eliminazione e la diminuzione dell'uso di alcune sostanze organiche persistenti considerate nocive per la salute umana e l'ambiente. Il Trattato internazionale individuò una prima lista di POP comprendente 12 sostanze o classi di sostanze tossiche, la cosiddetta "Sporca dozzina": insetticidi clorurati di prima generazione (aldrin, dieldrin, endrin, clordano, eptacloro, esaclorocicloesano, esaclorobenzene, mirex, DDT, toxafene), prodotti e sottoprodotti chimici industriali (PCB, diossine e furani), da monitorare e per cui venne prevista una graduale eliminazione. Il programma prevedeva la valutazione delle fonti, del trasporto a lungo raggio e dei livelli nell'ambiente di tali sostanze per poter poi eliminare l'utilizzo di pesticidi e di prodotti chimici industriali sostituendoli con composti alternativi e, una volta individuate le fonti, ridurre o eliminare le emissioni anche dei sottoprodotti. Questo accordo internazionale è entrato in vigore il 17 maggio del 2004, grazie alla ratifica del 50esimo paese firmatario della Convenzione.

Con la direttiva 2006/121/CE del 18 dicembre 2006, è stato, inoltre, istituito dall'Unione Europea (UE) il REACH (Registration, Evaluation Authorisation of Chemicals), un sistema integrato unico di registrazione, valutazione e autorizzazione delle sostanze chimiche. Il sistema REACH obbliga le imprese che fabbricano e importano sostanze chimiche a valutare i rischi derivanti dal loro uso ed a prendere le misure necessarie per gestire qualsiasi rischio venga individuato.

Le prime restrizioni riguardanti i PBDE sono state adottate, a livello europeo, con la direttiva 2003/11/CE (entrata in vigore nell'agosto 2004) che modifica la direttiva 76/769/CEE del Consiglio aggiungendo alla lista relativa alle restrizioni riguardanti talune sostanze e preparati pericolosi, il Penta-BDE e l'Octa-BDE; come riportato nell'allegato I punto [XX] e [XXbis]:

- "1. Non può essere immesso sul mercato o utilizzato come sostanza o come componente di sostanze o di preparati in concentrazioni superiori allo 0,1 % in massa.*
- 2. Non possono essere immessi sul mercato articoli contenenti tale sostanza, o parti nelle quali se ne fa uso in funzione di ritardante di fiamma, in concentrazioni superiori allo 0,1 % in massa."*

Tali restrizioni vengono successivamente riprese nelle direttive 2002/95/CE (direttiva RoHS: Restriction of the use of certain Hazardous Substances) e 2002/96/CE (direttiva WEEE/RAEE). La prima, stipulata da tutti gli Stati Membri della UE ed entrata in vigore il 1 giugno 2006, assicura che nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche non siano presenti piombo, mercurio, cadmio, cromo esavalente, polibromobifenili (PBB) o polibromodifenileteri (PBDE)

in concentrazioni superiori allo 0,1% in peso (tranne nel caso del cadmio limitato allo 0,01% in peso).

La direttiva WEEE (Waste Electric and Electronic Equipment) tratta invece lo smaltimento di rifiuti di apparecchiature elettriche ed elettroniche, ed è finalizzata a prevenire e limitare il flusso di tali rifiuti alle discariche, mediante politiche di riuso e riciclaggio degli apparecchi e dei loro componenti.

Decreti italiani.

In Italia queste direttive europee vengono attuate con il Decreto Legislativo 25 luglio 2006 n. 151, il quale mira a ridurre l'utilizzo di sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche ricalcando i limiti di concentrazione imposti dalla direttiva RoHS. Vengono inoltre promossi il reimpiego, il riciclaggio e le varie possibili forme di recupero dei RAEE così da ridurre la produzione di rifiuti. Il 3 aprile 2006 è stato emanato il Decreto Legislativo 156, conosciuto anche come Testo Unico Ambientale, la parte IV di questo decreto riguarda la gestione dei rifiuti, ma non sono presenti ancora normative che regolamentino in alcun modo la presenza di PBDE nelle matrici ambientali così da poterne monitorare e prevenire l'inquinamento

.

Il caso del deca-BDE.

Il deca-BDE è stato escluso dalla direttiva RoHS nell'ottobre del 2005 a seguito di una valutazione della sua tossicità iniziata nel 1994 e conclusasi nel 2004 che non ha riscontrato rischi per la salute e l'ambiente. L'esclusione del deca-BDE riguarda in modo specifico l'utilizzo di tale ritardante nei materiali polimerici dove viene immessa la miscela deca-BDE contenente fino al 3% di impurità.

Nel gennaio del 2006, il Parlamento Europeo e la Danimarca hanno intrapreso un procedimento legale contro la decisione della Commissione Europea; il 1 gennaio 2007 in Svezia l'uso del deca-BDE è stato proibito nell'industria tessile, nella produzione di mobili e cavi e in risposta a questi provvedimenti nazionali; la Commissione Europea ha iniziato una procedura legale contro la Svezia in quanto trasgressore delle leggi di mercato interno Europeo. Nella Direttiva RoHS viene infatti data ai produttori una chiara garanzia sull'impossibilità, da parte dei singoli stati membri dell'UE, di mettere al bando o sotto restrizione ritardanti di fiamma non esplicitamente indicati in essa.

Per quel che riguarda il deca-BDE una nuova decisione doveva essere presa entro il 2010: dopo vari rimandi per aggiornamenti, l'11 dicembre 2007 le Autorità Competenti responsabili della politica europea sui prodotti chimici esistenti, hanno riportato la conclusione di ulteriori studi convenendo con i risultati precedentemente ottenuti. Recentemente alcuni stati degli USA hanno posto l'accento sul problema dell'utilizzo del Deca-BDE, per tale composto sono state proposte

misure restrittive per quanto riguarda sia la produzione che l'utilizzo non solo in Maine ma anche in altri stati come New York, Washington, Minnesota e Michigan. Inoltre, visto il recente interesse degli organismi di controllo internazionale a questa problematica grandi multinazionali come, ad esempio, IKEA, Dell, Nec, Apple, Sharp, Samsung, etc., hanno fortemente limitato o bandito l'utilizzo della miscela Deca-BDE nei loro prodotti (*McPherson et al., 2004; Peele, 2004*).

1.4 - Scopo della tesi

I PBDE risultano essere le sostanze maggiormente impiegate tra i ritardanti di fiamma e per questo largamente diffuse nell'ambiente. Questi composti sono ubiquitari, sono stati ritrovati sia nelle zone di produzione e utilizzo, ovvero nelle regioni alle medie e basse latitudini, sia in luoghi molto lontani dalle sorgenti principali, come le regioni polari o i fondali oceanici. Molti studi sono stati condotti su questa classe di composti e ne è stata accertata la presenza in vari tipi di matrici: ambientali (suoli, fiumi, neve, acqua di mare, aria), biota (anfipodi talitridi, orsi polari, foche, krill, pesci di varie specie, uova di uccelli, etc.) e nei fluidi biologici umani (latte materno, sangue, urine). Dalla loro introduzione sul mercato, che risale agli anni settanta, il loro utilizzo è divenuto massiccio e incontrollato; ciò ha contribuito alla penetrazione dei PBDE in tutti i comparti ambientali.

Anche se le prime indicazioni della loro presenza nella fauna risalgono all'inizio degli anni '80, la natura diffusa della contaminazione da PBDE è stata riconosciuta solo nei primi anni '90. Già nel 1979 ne fu rilevata la presenza nel terreno e nei fanghi (*de Carlo, 1979*), nel 1981 in campioni di acqua lungo il fiume Viskan in Svezia (*Anderson and Blomqvist, 1981*). Per quanto riguarda l'uomo, negli anni si è registrato un rilevante aumento delle concentrazioni nel latte materno: in Svezia, negli anni settanta, non si rilevavano tracce di PBDE, mentre nel 1997 il contenuto medio era di 4 parti per miliardo (ppb); nel 2004 in campioni donati da 47 donne di Dallas e Austin (Texas), riportavano livelli medi di PBDE di 34 ppb, o ng/g di lipidi, con campioni di latte che arrivavano ad avere 419 ppb nei lipidi, questi valori erano i più alti mai trovati (*de Wit, 2002; Law et al., 2006; Schecter et al., 2004*).

Questo studio si propone, dunque, di approfondire le conoscenze sulla distribuzione di questi composti in matrici sia abiotiche che biotiche ponendo un particolare accento sulla ripartizione tra fasi e trasporto atmosferico a lungo raggio. Il progetto si suddivide in due argomenti principali: la loro presenza nelle zone ad elevato grado di antropizzazione e nelle zone a basso grado di antropizzazione.

Per quanto riguarda le zone più antropizzate è stata studiata una delle sue principali fonti, che sono gli impianti depurazione liquami; di questi sono stati analizzati campioni di acqua in

entrata e in uscita, aria prelevata in siti esterni ed interni all'impianto e i fanghi prodotti dai processi depurativi delle acque; per la matrice fango abbiamo messo a punto un nuovo metodo analitico che sfrutta saggi immunochimici (test ELISA). Abbiamo inoltre condotto uno studio sul biomonitoraggio ambientale andando a cercare un organismo adatto alla valutazione della contaminazione ambientale di PBDE.

Per quanto riguarda la presenza di PBDE in zone a basso grado di antropizzazione, abbiamo studiato il loro trasporto atmosferico a lungo raggio andando a ricercare i PBDE in campioni di neve e aria prelevati nelle Isole Svalbard, in Artico. Abbiamo inoltre condotto uno studio sul possibile bioaccumulo di questi inquinanti indagando sulla loro presenza nei tessuti della foca di Weddel, abbiamo avuto, infatti, l'occasione di poter studiare gli organi interni di due esemplari provenienti da Baia TerraNova in Antartide.

I dati ottenuti in questo studio, confrontati e integrati con quanto già presente in letteratura, ci consentiranno, quindi, di poter avere una visione d'insieme abbastanza completa circa la distribuzione globale dei PBDE, permettendoci di individuare con buona approssimazione i meccanismi di trasporto, distribuzione e degradazione che li coinvolgono.

2 - Presenza di PBDE in zone ad elevato grado di antropizzazione

2.1 - Studio di una delle principali sorgenti di PBDE: gli impianti di depurazione liquami

Le principali fonti dei PBDE, situate prevalentemente nella zone altamente antropizzate ed economicamente sviluppate, sono le industrie che producono plastiche, cui vengono addizionati questi composti, gli impianti di depurazione liquami, gli inceneritori, gli impianti di riciclaggio della plastica, di apparecchi elettrici e di dispositivi elettronici. Essendo i PBDE non legati covalentemente al materiale plastico, ma solo disciolti, possono essere facilmente rilasciati nell'ambiente dai prodotti stessi per effetto dell'usura nel tempo, molti oggetti di uso comune, quindi, che contengono questi ritardanti di fiamma al loro interno, possono divenire a loro volta una fonte importante di contaminazione.

Uno degli obiettivi di questo progetto di ricerca è quello di valutare qualitativamente e quantitativamente la presenza di PBDE in diverse matrici (aria, acqua, fango) provenienti da impianti di depurazione acque reflue. In questi impianti confluiscono scarichi civili e industriali e si ha, quindi, un inevitabile accumulo di inquinanti di vario tipo, sia organici che inorganici, tra i quali anche i PBDE; l'ampio utilizzo e la resistenza a fenomeni degradativi dei PBDE ci hanno portato a ipotizzare una presenza rilevante di questa classe di composti nel ciclo di depurazione dei liquami.

La conseguenza principale di questi microinquinanti organici nelle acque in uscita da un impianto di depurazione è rappresentato dal potenziale effetto tossico e/o letale sul biota presente nel corpo idrico recettore. Questa preoccupazione viene, inoltre, incrementata dal fatto che le acque depurate dall'impianto vengono utilizzate a scopo irriguo nelle campagne vicine o nei vivai, causando un potenziale rischio di tossicità per l'ambiente e per l'uomo.

La natura idrofobica di questa classe di composti ci suggerisce la loro tendenza a concentrarsi nel materiale particolato, ovvero nei fanghi prodotti dai processi depurativi; la conoscenza del contenuto di PBDE nei fanghi risulta inoltre importante in quanto quest'ultimi sono destinati, a seconda dell'impianto, a processi di incenerimento e/o alla produzione di compost. Nel primo caso la presenza di PBDE potrebbe comportare la generazione e la dispersione in atmosfera di composti estremamente tossici per l'uomo come le diossine dibenzopolibromurate (PBDD) e i furani dibenzopolibromurati (PBDF); nel secondo caso potrebbe causare non solo la contaminazione di suolo e piante ma anche la biomagnificazione nella catena alimentare.

Alla luce di quanto detto, i PBDE sono stati ricercati in campioni di acqua in ingresso e in uscita e nelle matrici fango ispessito prelevati in otto impianti di depurazione italiani.

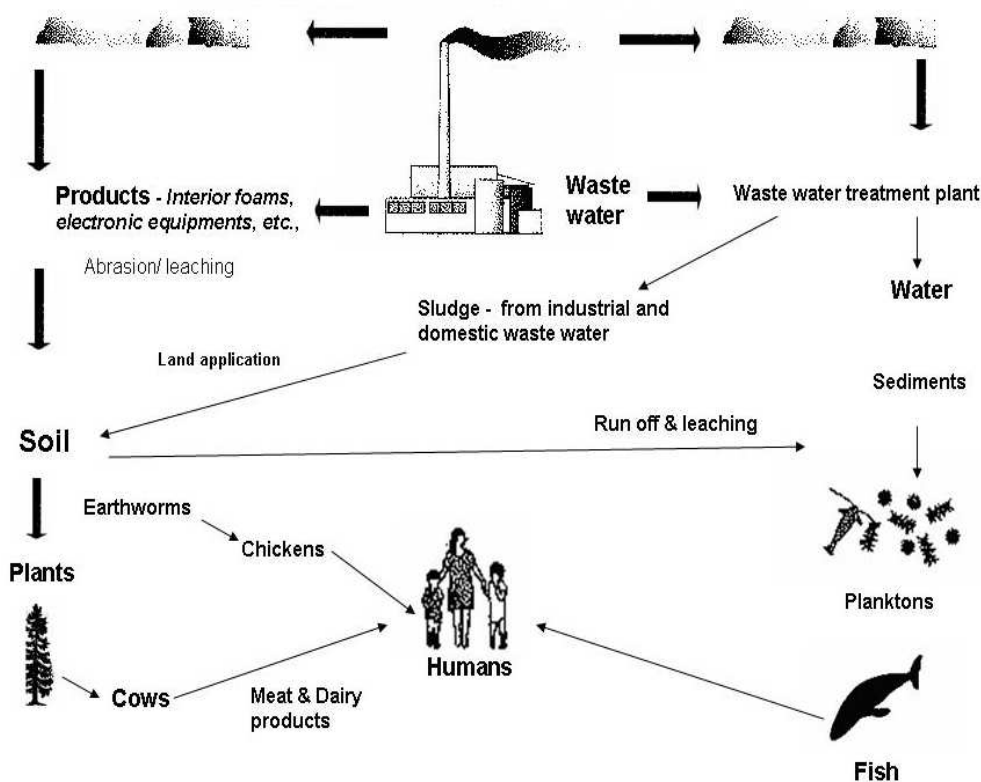


Figura 2.1.1 - Vie di rilascio e distribuzione di PBDE nell'ambiente provenienti da un impianto di depurazione liquami

Il nostro studio potrebbe quindi offrire importanti informazioni agli organi legislativi competenti per migliorare le attuali tecnologie di depurazione e formulare obiettivi di qualità per questa classe di composti organici che, provenendo da un inquinamento diffuso, non è facilmente eliminabile con gli attuali cicli di trattamento liquami. Recenti normative europee, riguardanti gli standard di qualità delle acque trattate, dedicano particolare attenzione alla rimozione di specifiche classi di inquinanti, la cui nocività è universalmente riconosciuta, come i PBDE. Con la recente proposta 10790/07 del 21 giugno 2007: Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on Environmental Quality Standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC – Political Agreement, vengono definiti gli standard di qualità ambientale (EQS) per polibromodifenileteri in acque superficiali (come fiumi, laghi, bacini artificiali); tale valore proposto è di 0,5 ng/L, inteso come media annuale e dato dalla somma dei congeneri BDE-28, -47, -99, -100, -153 e -154. Questa proposta europea, qualora dovesse essere attuata, resta comunque limitata ai congeneri contenuti nella miscela Penta-BDE, mentre non viene fornita alcuna indicazione per gli altri congeneri. Il Decreto

Ministeriale DM 367/03, “Regolamento concernente la fissazione degli standard di qualità per le acque” fissa il limite per il Pentabromodifenil etero a 0,001 µg/L al 31 dicembre 2008 e a 0,0005 µg/L al 2015.

In Italia i fanghi sono considerati, in generale, un rifiuto e il loro prevalente destino è lo smaltimento in discarica. A livello comunitario, l'utilizzo dei fanghi di depurazione in agricoltura è regolato dalla Direttiva 86/278/CEE e raggiunge il 40% del totale di fanghi prodotti, in Italia si è raggiunta una percentuale di riutilizzo del 32% nel 2003. Secondo la normativa D. Lgs. n. 99 del 27 gennaio 1992, che recepisce la Direttiva comunitaria 86/278/CEE, i fanghi di depurazione possono trovare impiego agronomico nel rispetto di alcune condizioni: devono essere stati sottoposti a trattamento (ossia a processi di stabilizzazione per contenere/eliminare i possibili rischi igienico-sanitari); devono essere idonei a produrre un effetto concimante e/o ammendante e correttivo del terreno; non devono contenere sostanze tossiche e nocive e/o persistenti, e/o bioaccumulabili in concentrazioni dannose per il terreno, per le colture, per gli animali, per l'uomo e per l'ambiente in generale. È importante, comunque, tener presente che la normativa di riferimento impone il controllo, per i fanghi da utilizzare in agricoltura, solo di alcuni parametri chimico-fisici, senza fare alcun riferimento a microinquinanti organici.

2.1.1 - Descrizione di un generico impianto di depurazione a fanghi attivi

Le acque di scarico, civile e industriale, possono contenere i materiali più svariati. Oltre ai materiali grossolani, gli inquinanti più pericolosi e difficili da abbattere sono costituiti da sostanze organiche, grassi, materiali scarsamente biodegradabili, microrganismi patogeni, coloranti, pesticidi, metalli pesanti, ecc.

Le acque reflue vengono purificate attraverso vari processi di trattamento che vengono distinti tradizionalmente in primari, secondari e terziari. I trattamenti primari sono di natura essenzialmente fisica e meccanica, volti all'eliminazione dei materiali più grossolani. I trattamenti secondari sono di tipo biologico e sono volti a ridurre le sostanze biodegradabili, portando ad un abbattimento del BOD (domanda biochimica di ossigeno). I trattamenti terziari sono processi chimici e chimico-fisici, rivolti all'affinamento della purificazione tramite processi mirati a specifiche classi di composti considerati pericolosi.

In figura 2.1.2 è riportato lo schema generico di un impianto di depurazione.

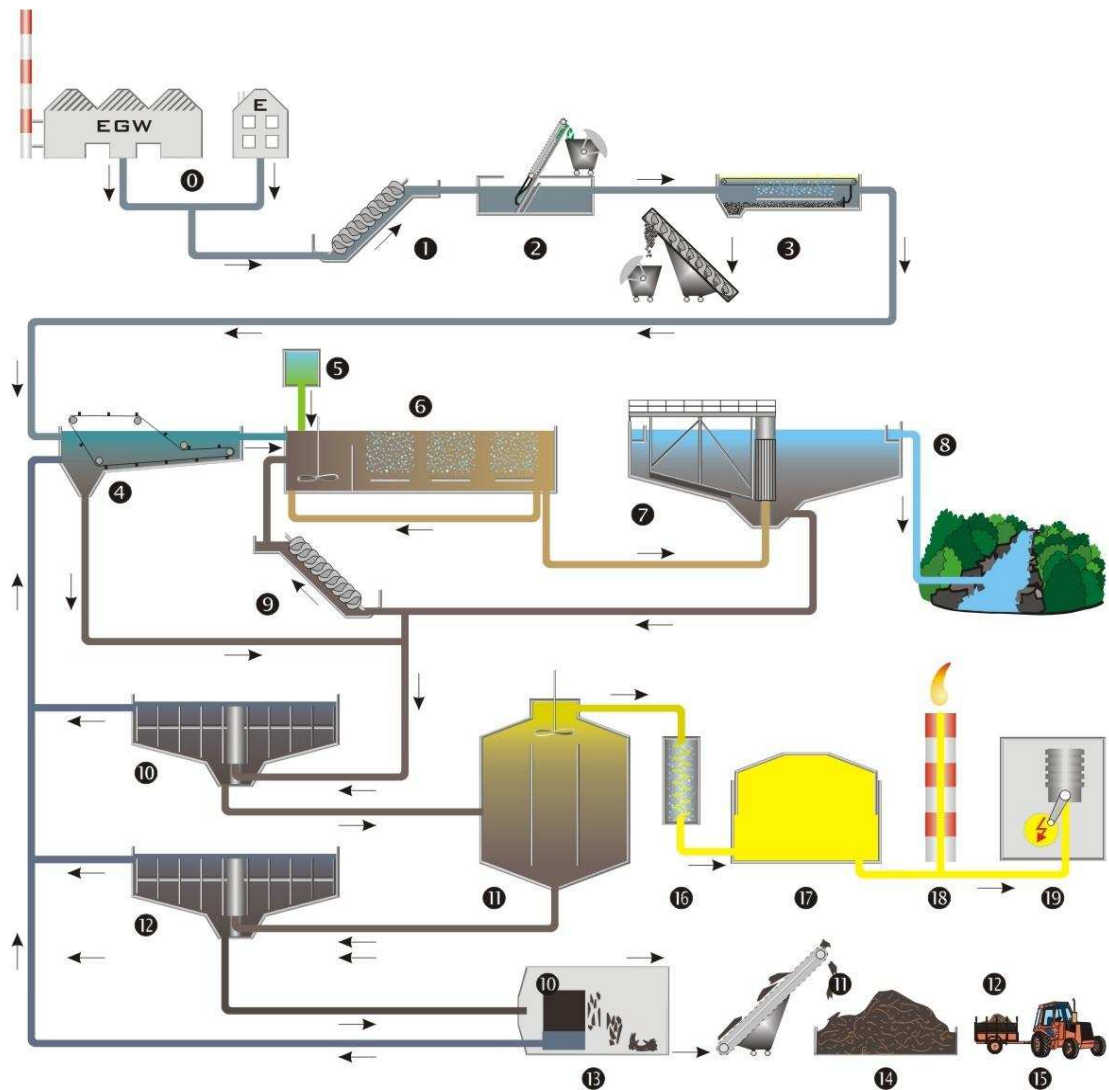


Fig 2.1.2 Schema di un impianto di depurazione acque reflue: sollevamento (1), grigliatura (2), dissabbiatura e disoleatura (3), vasca di sedimentazione primaria (4), vasca a fanghi attivi (6), vasca di sedimentazione finale (7), corso d'acqua superficiale (8), vasca di aerazione (9), preispessitore (10), digestore (11), postispessitore (12), disidratazione meccanica (13), accumulo e distribuzione dei fanghi (14) (15), gasometro (17), riutilizzo dei gas prodotti (16) (17) (18) e (19).

Linea acque: Le acque reflue afferenti all'impianto vengono convogliate e miscelate in una vasca iniziale dalla quale i liquami, attraversando una griglia verticale con spaziature di circa 20 cm, in grado di bloccare i materiali più grossolani, vengono inviati al **sollevamento**, che avviene tramite pompe a coclea, dette anche pompe a vite di Archimede. Quando vi sono particolari condizioni, come ad esempio precipitazioni meteorologiche di una certa entità, per le quali la portata in ingresso dei liquami supera la ricettività idraulica dell'impianto, viene attivato il by-pass, presente nella vasca di ingresso del depuratore, attraverso il quale le acque reflue

raggiungono direttamente il corpo recettore finale. I reflui sollevati sono sottoposti a una grigliatura fine, con spaziature di circa 20 mm, predisposta per poter allontanare materiale di piccole dimensioni.

Il processo successivo è quello della **dissabbiatura**, effettuata mediante il passaggio in appositi dissabbiatori anulari, con lo scopo di rimuovere particelle o corpi (sassolini, pezzi di vetro o metallo, ecc) che hanno caratteristiche idrodinamiche o di peso specifico simili alle sabbie vere e proprie. Le sabbie presenti si depositano, quindi, sul fondo della vasca, centrifugate e successivamente smaltite in discarica

Nonostante i trattamenti appena illustrati, i reflui continuano ad avere quantità elevate di sostanze in sospensione, soprattutto di natura colloidale, aventi un diametro inferiore a 10 µm. Per questo motivo viene effettuato un trattamento chimico-fisico di **coagulazione e flocculazione**: aggiungendo elettroliti nel refluo sotto agitazione (FeCl₃ o polielettroliti anionici) si va ad aumentare la probabilità di urto, la quale favorisce l'aggregazione delle particelle formando così fiocchi di dimensioni più grandi, tendenti a precipitare sotto l'effetto della gravità. Per rimuovere le sostanze oleose e quelle con densità minore dell'acqua si procede ad una fase di **disoleazione**, si opera in modo che tali sostanze restino in sospensione grazie alla spinta ascensionale, provocata dall'aria spinta dal basso, all'interno del bacino; questo materiale in superficie viene rimosso da un pettine raschiatore e convogliate in un pozzetto di stoccaggio.

Il problema principale che si presenta negli ambienti dove vengono effettuati i trattamenti preliminari (grigliatura, dissabbiatura e disoleatura) è la presenza di odori sgradevoli emessi dal liquame trattato. Per ovviare a questo inconveniente, questi ambienti sono sottoposti ad un continuo ricambio d'aria. L'aria uscente subisce un trattamento di **abbattimento degli odori** e viene quindi rilasciata nell'ambiente.

I liquami passano, per gravità, in un sistema di vasche con lenta agitazione, dove avviene una prima sedimentazione. Tramite questo processo i fiocchi, ottenuti con il trattamento chimico-fisico, si depositano sul fondo e i **fanghi primari** così ottenuti vengono raccolti ed inviati ad un impianto di ispessimento; il trattamento primario riesce a ridurre il livello dei liquami del 20-30%.

Una volta uscita dal trattamento primario, l'acqua decantata può essere convogliata nelle vasche di **equalizzazione**, la cui funzione è quella di rendere omogenee le acque reflue, così da acquisire caratteristiche qualitative pressoché costanti, condizione necessaria per ottenere la maggiore efficacia del processo di ossidazione biologica.

Il **trattamento biologico di ossidazione** consente la depurazione dei liquami dalle sostanze organiche solubili e biodegradabili grazie all'azione dei microrganismi. Questi, infatti,

nutrendosi della materia organica, si moltiplicano formando un fango insolubile, separabile con mezzi fisici convenzionali. Il processo biologico più comune è quello di tipo aerobico a “fanghi attivi”. L’ossigeno, necessario alla respirazione dei microrganismi, viene fornito da aeratori superficiali e da un sistema di diffusione dinamica dal fondo che, attraverso eiettori sommersi, insufflano l’ossigeno. Il fango, costituito dai microrganismi aggregati in fiocchi, viene accuratamente omogeneizzato con il liquame da depurare affinché la sua azione depurativa sia svolta uniformemente su tutta la massa d’acqua. Il liquame permane per diverse ore nelle vasche di ossidazione biologica, dopodiché viene inviato alla sedimentazione secondaria.

La rimozione dell’azoto, presente nei liquami urbani prevalentemente sotto forma organica, proteine e urea, richiede un trattamento specifico, composto da una fase di denitrificazione e di nitrificazione. La **denitrificazione** è un processo che sfrutta l’azione di batteri anaerobici come *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Archromobacter*, che sono in grado, in assenza di ossigeno disciolto, di ossidare i substrati organici utilizzando l’ossigeno dei nitrati. L’azoto che si forma viene successivamente strappato dal liquame, per mezzo dell’aria insufflata per aerare i microrganismi presenti nella seconda parte della vasca.

La **nitrificazione** sfrutta l’azione di due ceppi di batteri aerobici, *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, che intervengono rispettivamente nell’ossidazione di NH_4^+ a NO_2^- a NO_3^- . Questa operazione viene eseguita nella stessa vasca dei fanghi attivi in quanto non è competitiva e necessita di una buona aerazione. L’energia ricavata dall’ossidazione dei composti azotati non è molto alta, quindi i batteri hanno un tasso di crescita minore rispetto a quelli che ossidano le sostanze carboniose. Mantenere alta la presenza dei microrganismi permette di avere trattamenti biologici più veloci e quindi una depurazione maggiore di liquami. Questo processo di formazione di specie nitriche è necessario al fine di effettuare, dopo il ricircolo dei fanghi, la fase di denitrificazione la quale avviene soltanto partendo da forme ossidate; per questo motivo i sistemi di denitrificazione e nitrificazione sono sempre accoppiati in ogni tipo di trattamento biologico.

Nei **sedimentatori secondari** il fango si separa dal liquido chiarificato e si deposita sul fondo dove, tramite una lama raschiatrice, viene convogliato verso lo scarico posto al centro della vasca. Il fango prelevato dal fondo del sedimentatore viene in parte inviato alla linea di trattamento fanghi ed in parte riciclato nelle vasche di ossidazione. Tale fango viene detto attivo proprio perché la sua capacità depurativa aumenta con l’aumentare della sua riutilizzazione nel ciclo depurativo, ed è in grado, una volta venuto a contatto con del nuovo liquame ricco di sostanze organiche, di innescare meccanismi di riproduzione di microrganismi stessi.

Al termine del trattamento biologico a fanghi attivi, le sostanze inquinanti presenti nell’acqua trattata sono diminuite di circa l’80% rispetto alle concentrazioni presenti nel liquame in ingresso all’impianto

Dopo il trattamento secondario, l'acqua viene sottoposta ad un ulteriore trattamento di flocculazione, per ottenere la precipitazione sotto forma di fanghi delle particelle sfuggite al trattamento di ossidazione che sono rimaste in sospensione. A questi seguono **trattamenti terziari** di affinamento del processo depurativo e disinfezione che possono essere di vario tipo: filtrazioni, ozonizzazione, trattamenti con ipoclorito di sodio, passaggio sotto lampade UV, etc.

Linea fanghi: Il prodotto finale di ogni impianto di depurazione dei liquami non risulta costituito soltanto da acqua con accettabili caratteristiche di qualità ma, anche da altro materiale, i cosiddetti fanghi. Ogni impianto di depurazione delle acque deve prevedere una linea fanghi che provveda allo smaltimento di questo "sottoprodotto", che si forma sia dalla sedimentazione primaria sia dalla susseguente fase biologica.

I fanghi appaiono come un liquido bruno più o meno denso, una sospensione acquosa con circa l' 1% di solidi prevalentemente organici. I fanghi in arrivo dai sedimentatori secondari subiscono un trattamento di **ispessimento**, prima di essere inviati al successivo impianto di digestione anaerobica. Nei casi più comuni questa operazione solido-liquido viene condotta per gravità senza alcun dispendio energetico negli ispessitori. Può anche essere previsto un ispessimento di tipo meccanico con centrifughe, qualora la percentuale di sostanza solida nel fango da trattare sia bassa.

Questo materiale è facilmente putrescibile e richiede una fase di stabilizzazione biologica. La **stabilizzazione biologica** può avvenire: per via aerobica (aereazione per circa due settimane) con possibilità di smaltimento in agricoltura o mediante digestione anaerobica, in ambiente chiuso, con produzione di biogas durante la fermentazione e possibilità di recupero di calore per incenerimento del residuo solido. La **digestione anaerobica** è un processo grazie al quale si risolve uno dei problemi maggiori che si incontrano nello smaltimento dei fanghi, ovvero la loro putrescibilità; questa è legata ai microrganismi presenti, anche patogeni, che continuano a metabolizzare le sostanze biodegradabili residue. Ciò esclude, per motivi igienico-sanitari, lo smaltimento diretto dei fanghi in corsi d'acqua o sui suoli. Il trattamento avviene ad opera di opportuni microrganismi in grado di trasformare, metabolizzandole, le sostanze organiche biodegradabili in sostanze inorganiche non putrefattive e quindi non patogene. Oltre alla stabilizzazione viene eseguita la mineralizzazione del fango. Infine la digestione consente un ulteriore ispessimento del fango che può passare da uno 0,8% all'uscita dei fanghi attivi, ad un 4% all'ingresso del fangodotto.

Sono preferiti i batteri mesofili (Temperatura ottimale compresa tra 30-45°C), perché rappresentano un compromesso tra la necessità di una certa velocità di reazione e i costi da sostenere per il riscaldamento del reattore. Per impianti di elevata potenzialità si ha anche una grande produzione di biogas, che può essere utilizzato per soddisfare i fabbisogni energetici degli impianti stessi e quindi per recuperare parte dei costi totali richiesti dal processo. Operando ad una temperatura di 30-35°C, i tempi di digestione del fango sono di circa 15 giorni.

I fanghi stabilizzati sono estratti dal digestore e convogliati al trattamento di **disidratazione finale**. La disidratazione meccanica è operata da una nastro-presa o da centrifughe. Il fango disidratato viene essiccato per ridurre ulteriormente il suo volume prima di essere smaltito. I fanghi così trattati possono essere smaltiti/utilizzati nei seguenti modi: smaltimento in discarica, riutilizzo in agricoltura tal quali o previo compostaggio, incenerimento da soli o il co-incenerimento con i rifiuti; inserimento nella produzione di laterizi, asfalti, calcestruzzi.

2.1.2 - Gli impianti in esame

Nel nostro studio sono stati presi in considerazione 8 impianti di depurazione liquami situati in Toscana e in Lombardia.

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI CAIRATE (VARESE)

Proprietà	Tutela Ambientale Olona
Entrata in funzione	1990
Potenzialità	35.000 abitanti equivalenti
Portata media	12.500 m ³ /giorno
Carico organico	800 kg BOD ₅ /giorno
COD/giorno	1.600 Kg
Tipologia liquame	Mista (civile e industriale)
Comuni serviti	6

L'impianto di Cairate serve 6 comuni medio-piccoli nel centro della Provincia.

L'impianto di depurazione di Cairate riceve percolato di discariche controllate di rifiuti solidi urbani (R.S.U.), che è un refluo ad elevato tenore di inquinanti organici e inorganici. Il

trattamento di tale refluo è problematico sia per le elevate concentrazioni di inquinanti, sia per la variabilità delle sue caratteristiche. La modalità prevalente di gestione di questo flusso è quella di invio con autobotti agli impianti di depurazioni municipali.

Caratteristiche dell'impianto:

Pre-trattamento: grigliatura grossolana, sollevamento iniziale, grigliatura fine, dissabbiatura e disoleazione.

Trattamento biologico aerobico a biomassa sospesa (processo a fanghi attivi): denitrificazione nitrificazione, ossidazione e sedimentazione finale.

Ciclo di trattamento dei fanghi: pre-ispessimento per gravità (per i fanghi primari), stabilizzazione in digestori anaerobici (con produzione di biogas), post-ispessimento e disidratazione meccanica (con filtropresse a piastre).

Gli elementi degni di nota, che rendono questo impianto all'avanguardia, sono il digestore anaerobico con produzione di biogas per il recupero energetico, la sezione di filtrazione per il finissaggio dell'effluente e i processi di ossidazione/nitrificazione e denitrificazione.

L'acqua in uscita dall'impianto di depurazione, dopo aver subito un trattamento di disinfezione con ipoclorito di sodio, viene immessa tramite ruscellamento nel fiume Olona. I fanghi risultanti dal processo depurativo vengono smaltiti, previo compostaggio, in agricoltura.

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI PRAVACCIO (VARESE)

Proprietà	Tutela Ambientale Olona
Entrata in funzione	1984
Potenzialità	120.000 abitanti equivalenti (con la terza linea)
Portata media	30.000 m ³ /giorno
Carico organico	2.500 kg BOD ₅ /giorno
COD/giorno	5.650 Kg
Tipologia liquame	Mista
Comuni serviti	3 (tra i quali, in parte, Varese)

L'impianto di depurazione in località Pravaccio riceve gli scarichi di una parte della città di Varese; è dotato di digestore anaerobico con produzione di biogas per il recupero energetico.

Presso il depuratore sono in funzione: un impianto per il trattamento dei liquami provenienti da fosse biologiche, un impianto per il trattamento del percolato di discariche per RSU, un impianto per il trattamento dei reflui biodegradabili provenienti da unità produttive.

L'acqua in uscita dall'impianto di depurazione, dopo aver subito un trattamento di disinfezione, viene immessa tramite ruscellamento nel fiume Olona. I fanghi risultanti dal processo depurativo vengono smaltiti, previo compostaggio, in agricoltura.

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI SANT'ANTONINO TICINO (VARESE)

Proprietà	Tutela Ambientale Arno-Rile-Tenore S.p.A.
Entrata in funzione	1984
Potenzialità	420.000 abitanti equivalenti
Portata media	95.500 m ³ /giorno
Carico organico	13.650 kg BOD ₅ /giorno
COD/giorno	31.000 Kg
Tipologia liquame	Mista (civile e industriale)
Comuni serviti	27 (tra i quali Busto Arsizio e Gallarate + Aeroporto della Malpensa)

Tra i 56 depuratori presenti nel bacino del Ticino, l'impianto di Sant'Antonino a Lonate Pozzolo è quello più grande. Tratta le acque reflue di 25 comuni del centro sud della provincia, tra cui il distretto industriale del tessile. L'impianto è progettato per servire 420 mila abitanti equivalenti, un terzo dei quali è costituito da cittadini, due terzi da industrie (per lo più lava-tintorie e tintostamperie dell'area del Bustocco e del Gallaratese, oltre all'aeroporto di Malpensa). Lo stesso Parco del Ticino riconosce che Sant'Antonino è uno dei depuratori meglio strutturati. Il suo fiore all'occhiello è rappresentato dalla vasche di fito-depurazione.

Caratteristiche dell'impianto:

Pre-trattamento: grigliatura grossolana, sollevamento iniziale, grigliatura fine, dissabbiatura e disoleazione.

Trattamento biologico aerobico a biomassa sospesa (processo a fanghi attivi): denitrificazione nitrificazione, ossidazione e sedimentazione finale.

Trattamento terziario: filtrazione a sabbia per gravità, disinfezione (mediante ozonizzazione), ulteriore disinfezione (sotto lampade UV) e ulteriore disinfezione (con ipoclorito di sodio).

Ciclo di trattamento dei fanghi: pre-ispessimento per gravità (per i fanghi primari), stabilizzazione in digestori anaerobici (con produzione di biogas), post-ispessimento e disidratazione meccanica (con filtropresse a piastre).

Le acque depurate vengono scaricate indirettamente nel fiume Ticino, mentre il fango disidratato ha come destinazione finale il compostaggio per l'agricoltura.

In inverno si ha il passaggio delle acque trattate nell'area di fitodepurazione, che le affina ulteriormente dal punto di vista dell'abbattimento della carica batterica e del colore, e successivamente nel canale industriale Naviglio Grande; in estate, le acque in uscita dal depuratore vengono immesse nel collettore che le porterà nel canale secondario del Villoresi, all'altezza di Arconate, per l'utilizzo irriguo.

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI NOSEDO (MILANO)

Proprietà	Metropolitana milanese S.p.A
Potenzialità	1.250.000 abitanti equivalenti
Portata media	5 m ³ /s (432.000 m ³ al giorno)
Tipologia liquame	Mista (civile e industriale)

Si tratta dell'impianto più grande da noi studiato, da solo si occupa di circa il 50% delle acque reflue prodotte dalla città di Milano.

Lo schema di adduzione è costituito da cinque collettori principali in ingresso all'impianto: il collettore di Via Ripamonti, l'emissario di Nosedo, il collettore di Via San Dionigi, il collettore di Ampliamento Est e il collettore di Via S. Arialdo nel quale vengono convogliate le acque provenienti dall'abitato di Rogoredo.

Caratteristiche dell'impianto:

Pre-trattamento: grigliatura grossolana, sollevamento iniziale, grigliatura fine, dissabbiatura e disoleazione.

Trattamento biologico aerobico a biomassa sospesa (processo a fanghi attivi): denitrificazione nitrificazione, ossidazione e sedimentazione finale.

Trattamento terziario: defosfatazione, filtrazione a sabbia per gravità e disinfezione (con acido peracetico dosato a una concentrazione intorno a 2 mg/l di prodotto puro; con tale reagente chimico viene evitata la formazione, nelle acque trattate, di composti cloroderivati non compatibili con l'ambiente idrico recettore).

Ciclo di trattamento dei fanghi: ispessimento per gravità, stabilizzazione aerobica, condizionamento chimico e disidratazione meccanica (con filtropresse a piastre).

E' in corso la costruzione di un impianto di essiccamento termico dei fanghi.

L'intero volume delle acque scaricate dall'impianto è trattato per essere riutilizzato a scopo irriguo. Le acque in uscita dall'impianto sono condotte a tre recapiti superficiali: un primo recapito è la roggia Vettabbia Bassa, in un punto immediatamente a valle dell'impianto; un secondo è ancora la roggia Vettabbia Bassa, più a sud, mentre il terzo è il Cavo Redefossi, al confine tra il Comune di Milano e quello di San Donato Milanese. Le opere realizzate per la restituzione delle acque trattate ai corsi d'acqua superficiali garantiscono, nel complesso, una portata pari a 15 m³/s (in tempo di pioggia).

La produzione di fanghi disidratati meccanicamente (grado di siccità medio 32%) dall'impianto di Nosedo nell'anno 2006 è stata di 65.990,240 tonnellate. I fanghi vengono destinati in agricoltura previo trattamento di compostaggio.



Figura 2.1.3 - Vista aerea dell'impianto di Nosedo

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI SAN ROCCO (MILANO)

Proprietà	BRIANZACQUE S.R.L.
Potenzialità	1.050.000 abitanti equivalenti
Portata media	345.000 m ³ /giorno 4 mc/s
Tipologia liquame	Mista (civile e industriale)



Figura 2.1.4 - Vista aerea del complesso di Milano San Rocco

L'impianto di trattamento e recupero delle acque reflue di San Rocco, il secondo depuratore milanese come grandezza, ha una superficie di 12 ha ed è situato nelle terre di confine tra i comuni di Milano, Rozzano e Opera. Situato in una zona agricola caratterizzata dalla presenza di un fitto reticolo idrografico di rogge, in gran parte alimentate dalle acque di Roggia Ticinello, che dà origine e nome ad un importante comprensorio irriguo del Sud Milano.

L'impianto raccoglie e depura le acque reflue, sia civili che industriali, dei comuni dell'alto Lambro ovvero del settore occidentale della città, tramite un'apposita rete di collettori. Tutte le acque trattate in uscita dall'impianto, la cui portata si aggira sui 4 mc/s a medio regime, sono utilizzabili ai fini irrigui e reimmesse in due altre Rogge, Carlesca e Pizzabrasa.

Caratteristiche dell'impianto:

Pre-trattamento: grigliatura grossolana, grigliatura fine, sollevamento iniziale e dissabbiatura-disoleazione.

Trattamento biologico aerobico a biomassa sospesa (processo a fanghi attivi): denitrificazione, ossidazione, nitrificazione e sedimentazione finale.

Trattamento terziario: defosfatazione, filtrazione a sabbia aper gravità e disinfezione (mediante raggi UV).

Ciclo di trattamento dei fanghi: ispessimento dinamico, stabilizzazione aerobica, condizionamento chimico, disidratazione meccanica (con filtropresse a piastre) e essiccamento termico.

La stagione irrigua, negli ultimi tre anni, ha avuto una durata di circa quattro mesi, con inizio nel mese di maggio e chiusura nei primi giorni di settembre. Nell'anno 2006, la portata di acqua trattata convogliata al riutilizzo in agricoltura è stata di 10.800.000 m³. La restante portata di acqua trattata, pari a circa 81.500.000 m³ è stata scaricata, per gravità, nel colatore Lambro Meridionale.

I fanghi disidratati vengono smaltiti in agricoltura previo trattamento di compostaggio, mentre i fanghi essiccati termicamente (grado di siccità medio 90%) vengono, in parte, smaltiti presso cementifici e utilizzati come combustibile di sostituzione nel processo di cottura del clinker prodotto, e in parte destinati in agricoltura previo trattamento di compostaggio.

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI BACIACAVALLO (PRATO)

Proprietà	Gestione Impianti Depurazione Acque, G.I.D.A. S.p.a
Entrata in funzione	1981
Potenzialità	750.000 abitanti equivalenti
Portata media	6.000 m ³ /h e 130.000 m ³ al giorno
Tipologia liquame	Mista (civile industriale)

Questo impianto si estende su una superficie di circa 24 ettari, e ha una capacità depurativa di circa 750.000 abitanti equivalenti e una capacità massima di depurazione di 6000 m³/h.

I liquami che confluiscono nell'impianto di Baciacavallo derivano in larga parte dalle lavorazioni industriali, in particolar modo da quelle tessili, infatti, solo il 20% del volume totale dei liquami trattati sono di provenienza civile. Circa 100.000 m³ al giorno di media, proviene dalle attività industriali ed è caratterizzato dalla forte presenza di tensioattivi (soprattutto anionici e non ionici), oleanti tessili (oli emulsionanti utilizzati per lubrificare i macchinari e le fibre in lavorazione), coloranti (prevalentemente di natura organica) e da particelle solide sospese (soprattutto pelurie e piccoli frammenti di fibra di lana residui delle lavorazioni).



Figura 2.1.5 - Veduta aerea dell'impianto di Baciacavallo

Caratteristiche dell'impianto:

Pre-trattamento: grigliatura grossolana, sollevamento iniziale, grigliatura fine, dissabbiatura, disoleazione e sedimentazione primaria

Trattamento biologico aerobico a biomassa sospesa (processo a fanghi attivi): ossidazione biologica e sedimentazione secondaria.

Trattamento terziario: chiari flocculazione e ozonizzazione.

Ciclo di trattamento dei fanghi: ispessimento per gravità, disidratazione meccanica (in centrifughe) e termodistruzione (in forno inceneritore).

La parte in eccedenza alle capacità di trattamento del termodistruttore (che da progetto risulta essere di 1.270 Kg/h), viene inviata nella discarica o, nel caso abbia caratteristiche idonee, a spargimento sul suolo.

I reflui uscenti dall'ozonizzatore vengono convogliati in una canalizzazione interna all'impianto per poi essere scaricati nella gora di Palasaccio, che confluisce nel fiume Ombrone Pistoiese al confine fra il Comune di Prato e quello di Poggio a Caiano (FI).

Una parte dei reflui in uscita dall'ozonizzatore (circa 100 litri al secondo) viene inviata all'impianto di post-trattamento della società Idra SPA, per essere utilizzata nell'acquedotto industriale.

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI CALICE (PISTOIA)

Proprietà	Gestione Impianti Depurazione Acque, G.I.D.A. S.p.a
Entrata in funzione	1985
Potenzialità	160.000 abitanti equivalenti
Portata media	30.000-40.000 m ³ al giorno
Tipologia liquame	Mista (civile e industriale)

L'impianto di depurazione di Calice è situato nei pressi di Agliana (PT) in una zona caratterizzata da numerosi insediamenti civili ed industriali, prevalentemente tessili, e provvede alla depurazione di entrambe le tipologie di refluo provenienti dalle zone di Prato Ovest e Montemurlo. L'impianto è localizzato in prossimità di importanti arterie di traffico autostradali (A11) e extraurbane (strada provinciale Prato-Pistoia) le quali contribuiscono ad una contaminazione diffusa della zona. La composizione dei reflui in entrata a tale impianto è quindi inevitabilmente correlata alle attività che li producono ed a tutti i processi che durante la fase di

trasporto dei liquami all'impianto di depurazione possono contribuire in maniera significativa alla presenza degli inquinanti monitorati.

L'impianto in esame si compone di due linee depurative distinte relative rispettivamente al trattamento dei reflui, sia civili che industriali, e a quello dei liquami delle fosse settiche e dei percolati. Le due tipologie di refluo vengono riunite dopo i necessari trattamenti fisici preliminari; tale struttura permette la depurazione di circa 30.000-40.000 m³ di refluo al giorno con una potenzialità dell'impianto pari a circa 160.000 abitanti equivalenti (calcolato in base al COD medio in entrata).

Caratteristiche dell'impianto:

Pre-trattamento: grigliatura grossolana, sollevamento iniziale, grigliatura fine, dissabbiatura, disoleazione e sedimentazione primaria

Trattamento biologico aerobico a biomassa sospesa (processo a fanghi attivi): denitrificazione, ossidazione biologica, nitrificazione e sedimentazione secondaria.

Trattamento terziario: chiari flocculazione e disinfezione (mediante ozonizzazione).

Trattamento dei fanghi: ispessimento per gravità e disidratazione meccanica (con centrifuga e filtropressa).

Le acque ozonizzate vengono fatte confluire nel fiume Calice, fiume a regime torrentizio.

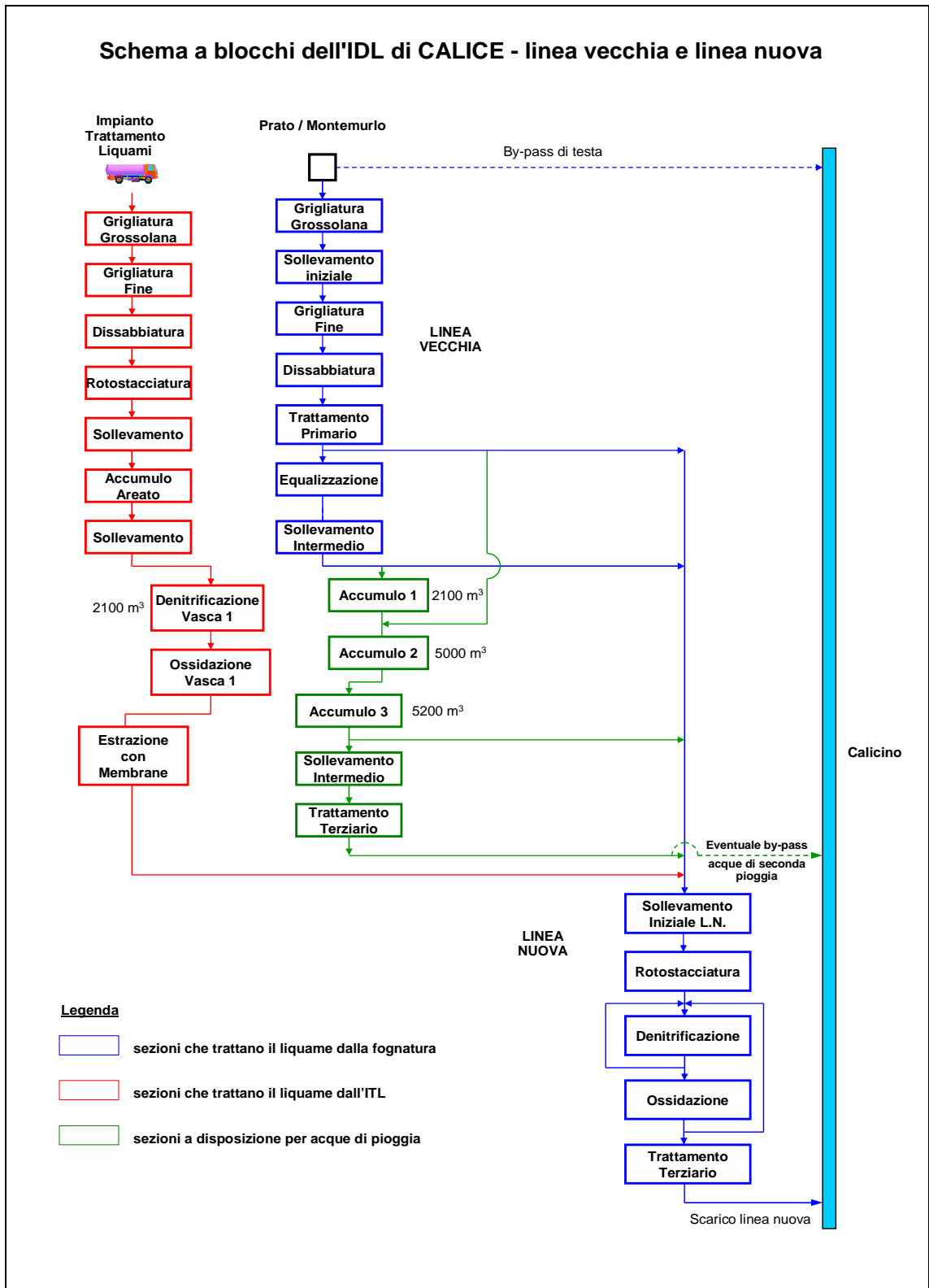


Figura 2.1.6 - Schema dell'impianto di depurazione di Calice

IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI SAN COLOMBANO (FIRENZE)

Proprietà	Publiacqua S.p.a
Entrata in funzione	2002
Potenzialità	600.000 abitanti equivalenti
Portata media	3.300 m ³ /h
Carico organico	60gr/ab. eq./giorno di BOD
Tipologia liquame	Civile
Comuni serviti	7 (Firenze, Campi Bisenzio, Calenzano, Sesto Fiorentino, Signa, Lastra a Signa e Scandicci)

La realizzazione di questo impianto è stata fortemente voluta in quanto l'area fiorentina necessita di un rimedio al pesante inquinamento delle acque dell'Arno. L'area scelta per l'ubicazione dell'impianto è S.Colombano presso il Comune di Lastra a Signa, dove confluiscono i collettori fognari della riva destra e sinistra (non ancora completamente realizzata) dell'Arno, attraverso un tunnel in acciaio di diametro 3900mm, completamente ispezionabile posato in sub-alveo del fiume. Il depuratore è stato progettato per servire un'utenza di 600000ab/eq.: l'impianto è suddiviso in tre lotti, ognuno dei quali ha un'utenza di 200000ab/eq con carico organico pari a 60gr/giorno di BOD. Il primo è in via di completamento, mentre per gli altri due non sono ancora iniziati i lavori.

Caratteristiche dell'impianto:

Pre-trattamento: grigliatura grossolana, sollevamento iniziale, grigliatura fine, dissabbiatura, disoleazione e sedimentazione primaria

Trattamento biologico aerobico a biomassa sospesa (processo a fanghi attivi): denitrificazione, ossidazione biologica, nitrificazione, defosfatazione biologica e sedimentazione secondaria.

Trattamento terziario: disinfezione (mediante clorazione) e filtrazione a sabbia.

Le acque trattate vengono scaricate direttamente in Arno o convogliate presso aree industrializzate.

Il trattamento sulla linea fango, presso l'impianto di S.Colombano, si limita alla sola fase di stabilizzazione finale mediante digestione aerobica con formazione di biogas, che subisce desolfurazione e cogenerazione. Prima dell'ingresso nei digestori, il fango subisce una fase di ispessimento di tipo meccanico in centrifughe e una fase di pre-riscaldamento.

Il biogas prodotto durante la digestione anaerobica del fango, ha un potere calorifico di circa 5300Kcal/Nm³. Per questo è prevista la cogenerazione di questo biogas con il conseguente recupero di energia elettrica e termica. L'obiettivo è di poter autoalimentare l'impianto, che

altrimenti spenderebbe oltre 400 milioni l'anno solo di energia elettrica, oltre a fornire luce ad un paese come S.Colombano che conta circa 2000 abitanti. Inoltre l'energia termica recuperata viene utilizzata per il riscaldamento dei fanghi in ingresso al digestore e per il riscaldamento dei locali.

I fanghi, uscenti dai due digestori anaerobici, vengono pompati entro un apposito "fangodotto", lungo circa 8 Km, all'area dell'impianto di compostaggio di "Case Passerini", nel comune di Sesto Fiorentino, ove sono sottoposti alla fase di disidratazione finale, e quindi possono essere o avviati alla discarica, o trattati per compostaggio insieme alla porzione organica dei rifiuti solidi urbani.

2.1.3 - Campionamento e trattamento dei campioni

I campioni analizzati provengono dagli 8 impianti di depurazione liquami descritti nel paragrafo precedente e consistono in campioni di acqua in ingresso e in uscita agli impianti e dei fanghi ispessiti. I campioni sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi.

In tabella 2.1.1 è riportata la lista dei campioni analizzati.

I campioni acquosi in ingresso e in uscita sono stati sottoposti ad una preliminare filtrazione, per cui il trattamento e l'analisi sono state effettuate separatamente sulla fase disciolta e sulla fase particolato.

Tipologia campione	Impianto	Campionamento
Acqua ingresso	Baciacavallo	2007
Acqua uscita	Baciacavallo	2007
Fango ispessito	Baciacavallo	2007
Fango ispessito	Baciacavallo	2007
Fango ispessito	San Colombano	2008
Fango ispessito	Baciacavallo	2009
Fango ispessito	San Colombano	2009
Fango ispessito	Calice	2009
Acqua ingresso	Pravaccio	2010
Acqua uscita	Pravaccio	2010
Fango ispessito	Pravaccio	2010
Acqua ingresso	Cairate	2010
Acqua uscita	Cairate	2010
Fango ispessito	Cairate	2010
Acqua ingresso	S. Antonino Ticino	2010
Acqua uscita	S. Antonino Ticino	2010
Fango ispessito	S. Antonino Ticino	2010
Acqua ingresso	Nosedo	2010
Acqua uscita	Nosedo	2010
Fango ispessito	Nosedo	2010
Acqua ingresso	San Rocco	2010
Acqua uscita	San Rocco	2010
Fango ispessito	San Rocco	2010

Tabella 2.1.1 - I campioni analizzati

Filtrazione dei campioni acquosi

L' apparato di filtrazione, per i campioni acquosi, è costituito da un contenitore in acciaio Inox, dove viene trasferito il campione, dall'unità di filtrazione, costituita da due dischi di acciaio tra cui viene posizionato un filtro in fibra di quarzo (porosità 0.47 μm), e da un contenitore per la raccolta dell'acqua filtrata (vedi figura 2.1.7).

Il contenitore di acciaio è dotato di due valvole: una per l'ingresso di azoto e l'altra per l'uscita dell'acqua che deve essere filtrata, quindi vengono collegate, attraverso cavi anch'essi di acciaio, rispettivamente ad una sorgente esterna di azoto e all'unità di filtrazione.

Il campione di acqua viene versato nel contenitore di acciaio attraverso un'apertura che si trova alla sommità di esso, che poi viene chiusa ermeticamente. A questo punto viene azionato il flusso di azoto ultrapuro ad una pressione di 200 ml/min, il quale forza il campione di acqua a passare dall'interno del contenitore all'unità di filtrazione.

Sul filtro in fibra di Quarzo, posizionato all'interno dell'unità di filtrazione, si raccoglie il particolato mentre l'acqua filtrata passa nel contenitore di raccolta.

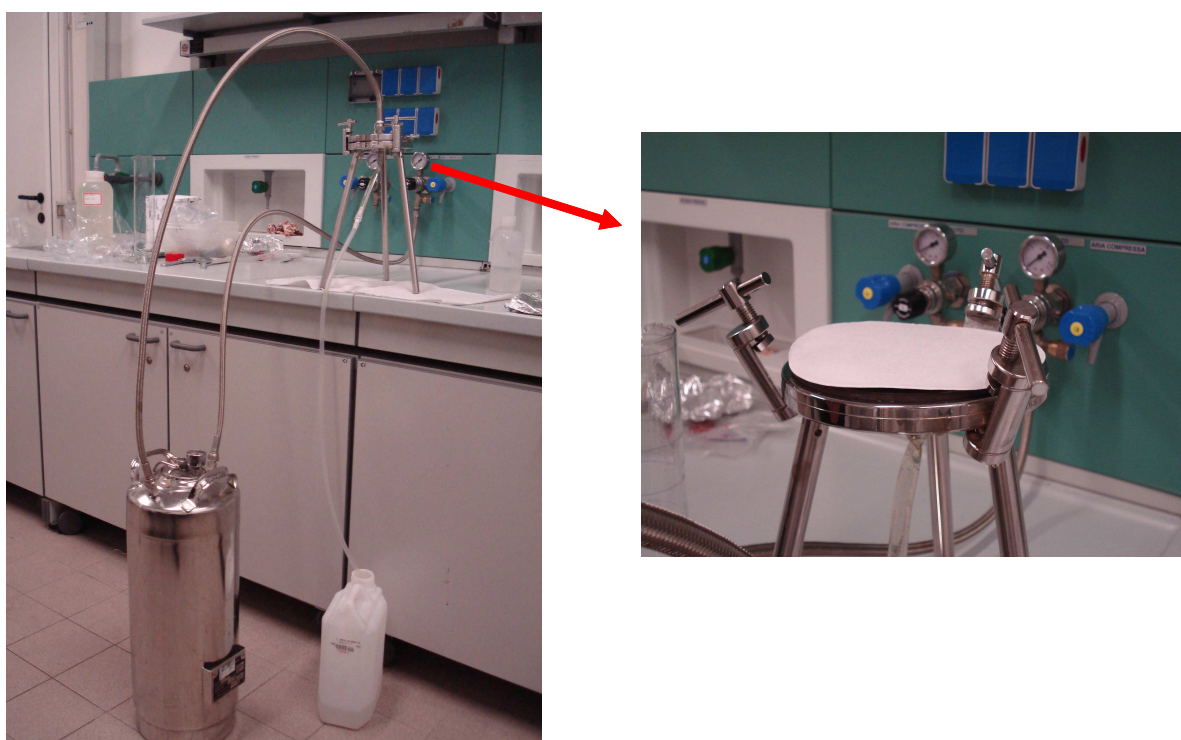


Figura 2.1.7 - Impianto di filtrazione

Qualora la quantità di particolato presente nel campione di acqua da filtrare, sia tale da saturare il filtro, si procede alla sostituzione del filtro con uno nuovo. I filtri utilizzati sono stati precedentemente trattati in muffola a una temperatura di 400°C per 12 ore.

Estrazione dei campioni

Campioni acquosi-Fase disciolta:

I campioni acquosi filtrati (2 litri per i campioni in ingresso e 4 litri per i campioni in uscita) sono stati estratti mediante una triplice estrazione liquido-liquido in imbuto separatore con esano. Per la prima estrazione sono stati usati 200 ml di solvente, per le seguenti 100 ml.

Prima di procedere all'estrazione sono stati aggiunti 10 ml di MeOH e 150 g di NaCl con lo scopo di sfavorire la formazione di emulsione e aumentare l'efficienza di estrazione. Inoltre è stato aggiunto il recovery standard BDE-77 (0.055 ng/μl): 100 μl nei campioni in uscita e 200 μl in quelli in ingresso.

Campioni acquosi-Fase particolato:

Prima dell'estrazione i filtri sono stati sottoposti a disidratazione in liofilizzatore (5 Pascal) per 24 ore, in quanto la presenza di acqua potrebbe essere causa di perdita degli analiti nelle fasi successive del trattamento, ma soprattutto danneggerebbe in modo irreversibile la colonna del gascromatografo.

I filtri liofilizzati sono stati estratti in soxhlet per 16 ore utilizzando come solvente estraente una miscela esano-acetone (3:1 v/v). Prima dell'estrazione sono stati aggiunti 100 μl del recovery standard BDE-77 (0.055 μg/ml). Gli estratti sono stati rotavaporati fino ad un volume di circa 5 ml e successivamente portati a piccolo volume (circa 1 ml), in bagno di ghiaccio, sotto leggero flusso di azoto, prima di procedere alla fase di clean-up.

Campioni di fango

Per la determinazione dei PBDE nei fanghi è stata seguita la metodica ISO 22032:2006/E "*Water quality-determination of selected polybrominated diphenyl ethers in sediment and sewage sludge- method using extraction and gas chromatography/mass spectrometry*". Tale metodica è stata messa a punto per questo tipo di matrice scegliendo i solventi di estrazione e le procedure di clean-up più adatte all'estrazione dei PBDE dai nostri campioni.

I campioni di fango sono stati sottoposti al preliminare trattamento di liofilizzazione che, data l'elevata percentuale di acqua contenuta, si è protratto per 48 ore circa. I fanghi liofilizzati sono stati omogeneizzati con pestello ed estratti circa 5 g in apparato soxhlet per 16 ore, utilizzando come estraente una miscela esano-acetone (4:1 v/v), dopo aver aggiunto 200 μl dello standard BDE-77 (0.055 μg/ml) come recovery standard.

Gli estratti sono stati portati a un volume di circa 5 ml con rotavapor e successivamente a un volume di 2 ml, in bagno di ghiaccio sotto leggero flusso di azoto.

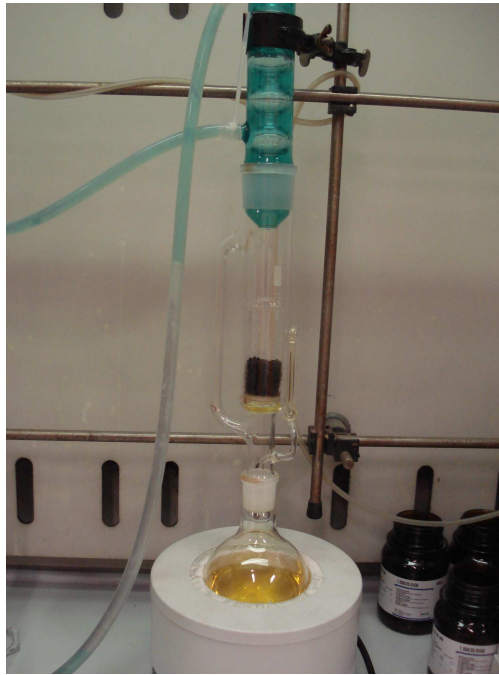


Figura 2.1.8 - Apparato soxhlet per l'estrazione del fango

Procedura di Clean-up

Gli estratti dei campioni, soprattutto i fanghi e i campioni dell'acqua in ingresso dei vari impianti di depurazione, si presentavano inizialmente di colore intenso e ricchi di sostanze organiche, per cui la fase di clean-up è stata fondamentale per eliminare composti che avrebbero potuto interferire in fase di analisi GC.

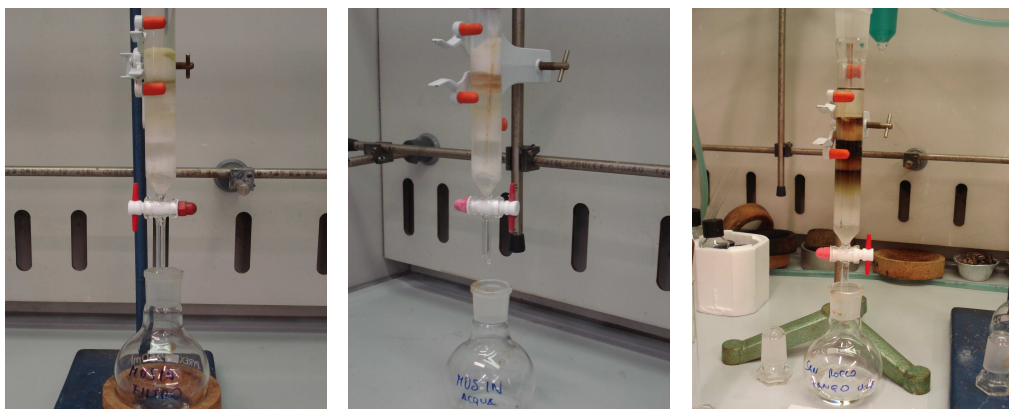


Figura 2.1.9 - Colonne di clean-up dell'estratto della fase particolato (a sinistra), della fase disciolta (nel centro) e di un fango (a destra).

Per il clean-up sono state usate tre tipi di silice ottenute trattando la silice, muffolata a 250 °C per 8h, con tre reagenti diversi: nitrato di argento, acido solforico e idrossido di sodio.

Procedura per il trattamento della silice:

-Silice trattata con nitrato di argento: 45 g di silice trattati con 5 g di AgNO_3 , sciolti in 25 ml di acqua. La soluzione di AgNO_3 è stata aggiunta, goccia a goccia, sotto agitazione per 8h. La silice è stata successivamente trattata in una stufa a 150° C per 12h e quindi conservata in bottiglie scure di vetro.

-Silice trattata con acido solforico: 56 g di silice trattati con 44 g di acido solforico al 95%, aggiunto goccia a goccia sotto agitazione per 8h e conservata in bottiglie di vetro scure.

-Silice trattata con idrossido di sodio: 33 g di silice trattati con 17 g di idrossido di sodio (1mol/l), aggiunto goccia a goccia sotto agitazione per 8h.

È stata utilizzata la stessa procedura di clean-up sia per i campioni acquosi che per i campioni di fango: gli estratti, una volta portati a un volume di 2 ml, sono stati purificati attraverso una colonna multistrato, in vetro, lunga 190 mm e con diametro interno di 22 mm.

La colonna multistrato è stata impaccata, partendo dal basso, con: 2 g di silice, 5 g di silice trattata con idrossido di sodio (per la rimozione dei composti acidi), 2 g di silice, 10 g di silice trattata con acido solforico (per la rimozione di composti basici), 2 g di silice, 5 g di silice trattata con nitrato di argento (per la rimozione dello zolfo e di composti contenenti zolfo), 10 g di solfato di sodio anidro (per la rimozione dell' acqua eventualmente presente nel campione estratto).

La colonna è stata condizionata con 50 ml di diclorometano e con 50 ml cicloesano. I campioni sono stati eluiti con 50 ml di cicloesano seguiti da una miscela costituita da cicloesano-diclorometano (4:1 v/v).

Gli eluati, riuniti in un unico pallone, sono stati rotavaporati fino a un volume di 5 ml e portati a un volume di 2 ml, in bagno di ghiaccio, sotto leggero flusso di azoto.

Successivamente 1 μl dell'estratto purificato è stato sottoposto ad analisi gas-cromatografica accoppiata a spettrometria di massa.

Tutti i solventi utilizzati sono ad alto grado di purezza e di tipo pestanal.

Analisi dei campioni con il GC-NCI-MS

L'identificazione dei composti presenti nei campioni analizzati e la loro successiva quantificazione è stata effettuata utilizzando una tecnica cromatografica in grado di determinare composti organici presenti anche a livello di tracce: Gascromatografia accoppiata a Spettrometria di massa (GC-MS).

Per la determinazione dei PBDE è stato scelto un sistema di generazione di ioni negativi (NCI, Negative Chemical Ionization) per la rilevazione di massa e prende il nome di GC-NCI-MS; questa tecnica è preferibile quando è necessario avere alta sensibilità nella quantificazione a discapito di una minore specificità, adatta, quindi, ai nostri campioni, viste le basse concentrazioni di PBDE da determinare.

Per l'identificazione e la determinazione quantitativa degli estratti è stato scelto di utilizzare un gascromatografo 6890 Hewlett Packard accoppiato ad uno spettrometro di massa 5973 SD con sorgente a ionizzazione chimica negativa e detector a quadrupolo GC-NCI-MS.

Per le analisi sono state utilizzate due diverse colonne gascromatografiche: una specifica per i PBDE a basso grado di bromurazione (colonna capillare DB-35 lunga 30 m con diametro interno di 0.25 mm e spessore del film liquido di 0.25 µm) ed una per i PBDE ad alto grado di bromurazione (colonna capillare DB-5MS lunga 15 m con diametro interno 0,25 mm e spessore del film liquido di 0,10 µm).

Le condizioni strumentali applicate per i congeneri inferiori sono state le seguenti:

- Metodo di iniezione: Splitless
- Temperatura di iniezione: 250°C
- Volume di iniezione: 1 µl
- Transfer line temperature: 150°C-270°C
- Sorgente di ioni: 150°C
- Quadrupolo: 106°C
- Risoluzione: Bassa risoluzione, 1 unità di massa
- Gas di trasporto: CH₄
- Flusso di purge: 19.9 ml/min
- Tempo di purge: 1.50 min
- La programmata di temperatura: 50°C per 1 min, poi 20°C/min fino a 130°C, poi 5°C/min fino a 300°C, poi 20°C/min fino a 251°C. Tempo totale di 57.45 minuti.

Le condizioni strumentali applicate per il BDE-209 sono state le seguenti:

- Metodo di iniezione: Splitless
- Temperatura di iniezione: 250°C
- Volume di iniezione: 1 µl
- Transfer line temperature: 150°C-270°C
- Sorgente di ioni: 150°C
- Quadrupolo: 106°C
- Risoluzione: Bassa risoluzione, 1 unità di massa
- Gas di trasporto: He

- Flusso di purge: 19.9 ml/min
- Tempo di purge: 1.50 min
- La programmata di temperatura: 90°C per 1 min, poi 30°C/min fino a 220°C, poi 10°C/min fino a 300°C per 8 min. Tempo totale di 21.33 minuti.

I frammenti di massa sono stati monitorati lavorando in SIM (Selected Ion Monitoring).

Per la qualificazione di tutti i congeneri in esame sono stati usati i seguenti ioni: 81, 159, 181.

Per la quantificazione è invece stato utilizzato lo ione 79.

In tabella 2.1.2 sono riportati i singoli congeneri ricercati:

Composto ricercato	Sigla
2,4-dibromodifeniletere	BDE-7
4,4'-dibromodifeniletere	BDE-15
2,2',4-tribromodifeniletere	BDE-17
2,4,4'-tribromodifeniletere	BDE-28
2,2',4,4'-tetrabromodifeniletere	BDE-47
2,2',4,5-tetrabromodifeniletere	BDE-49
2,3',4,4'-tetrabromodifeniletere	BDE-66
2,3',4',6-tetrabromodifeniletere	BDE-71
2,2',3,4,4'-pentabromodifeniletere	BDE-85
2,2',4,4',5-pentabromodifeniletere	BDE-99
2,2',4,4',6-pentabromodifeniletere	BDE-100
2,3',4,4',6-pentabromodifeniletere	BDE-119
3,3',4,4',5-pentabromodifeniletere	BDE-126
2,2',3,4,4',5'-esabromodifeniletere	BDE-138
2,2',4,4',5,5'-esabromodifeniletere	BDE-153
2,2',4,4',5,6'-esabromodifeniletere	BDE-154
2,3,3',4,4',5-esabromodifeniletere	BDE-156
2,2',3,4,4',5',6-eptabromodifeniletere	BDE-183
2,2',3,4,4',5',6-eptabromodifeniletere	BDE-184
2,3,3',4,4',5',6-eptabromodifeniletere	BDE-191
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifeniletere	BDE-209
Recovery Standard	
3,3',4,4' - tetrabromodifeniletere	BDE-77

Tabella 2.1.2 - Congeneri ricercati nei campioni del presente studio

Validazione del metodo

Per la determinazione quantitativa dei vari PBDE sono state costruite rette di taratura, una per ciascun congenere, mediante la triplice iniezione di soluzioni standard.

Per tutti i BDE ricercati, tranne il 209, sono state preparate 8 miscele standard ottenute per diluizione da una soluzione madre (BDE-MXE, Wellington Laboratories), miscela di PBDE aventi concentrazione:

Concentrazione BDE 3-126 = 0.1 ng/μl

Concentrazione BDE 138-197 = 0.2 ng/μl.

Per il BDE-209 sono state preparate 8 soluzioni standard ottenute per diluizione da una soluzione madre avente concentrazione BDE-209 = 50 ng/μl.

In tabella 2.1.3 sono riportate, per i congeneri ricercati, R^2 e range di risposta lineare delle rette di taratura.

Le concentrazioni dei congeneri, determinate per ciascun campione, sono state, infine, corrette per il recovery.

Il BDE-77 è stato scelto come recovery standard in quanto assente nei campioni esaminati, come hanno dimostrato precedenti prove di estrazione effettuate su aliquote degli stessi campioni di acqua e fango.

I recovery medi, calcolati per lo standard interno, sono stati di 65% per la fase disciolta e di 74% per la fase particolato dei campioni acquosi, di 99% per i campioni di fango.

Il detection limit (LOD), che rappresenta il segnale più basso che può essere distinto dal segnale di fondo per un bianco e che viene espresso come $d.l.=3*\text{deviazione standard del rapporto segnale/rumore}$, è risultato per i campioni di fango tra 12 e 54 pg/g mentre per i campioni acquosi tra 1,6 e 9,5 pg/L.

Congenere	Range di risposta lineare (picogrammi iniettati, pg)	R² della retta
BDE-7	2,5-100	0.9949
BDE-15	2,5-100	0.9936
BDE-17	2,5-100	0.9943
BDE-28	2,5-100	0.9928
BDE-49	2,5-100	0.9936
BDE-71	2,5-100	0.994
BDE-47	2,5-100	0.9994
BDE-66	2,5-100	0.9918
BDE-77	2,5-100	0.9887
BDE-100	2,5-100	0.9844
BDE-119	2,5-100	0.9901
BDE-99	2,5-100	0.9903
BDE-85+126	2,5-100	0.9849
BDE-154	5-200	0.986
BDE-153	5-200	0.9844
BDE-138	5-200	0.9812
BDE-156	5-200	0.9773
BDE-184	5-200	0.9828
BDE-183	5-200	0.9807
Congenere	Range di risposta lineare (picogrammi iniettati, pg)	R² della retta
BDE-191	5-200	0.9753
BDE-209	10-500	0.9821

Tabella 2.1.3 - Range di risposta lineare e R² delle rette di taratura per i congeneri.

2.1.4 - Risultati

L'accumulo di microinquinanti organici all'interno di un impianto di depurazione liquami è dovuto principalmente agli scarichi civili e, soprattutto, industriali che qui confluiscono; altre fonti, però, determinano la loro presenza nelle acque reflue come insediamenti produttivi nelle zone limitrofe all'impianto, acque meteoriche di dilavamento di aree urbanizzate, deposizioni atmosferiche secche ed umide connesse alle emissioni gassose industriali e civili, traffico veicolare e particelle aerotrasportate. Ogni impianto ha, quindi, delle specifiche caratteristiche determinate dal luogo in cui è costruito e l'area urbana che serve, ci aspettiamo, così, livelli di concentrazioni di PBDE molto alti in impianti di depurazione locati in zone industrializzate e nei quali confluiscono scarichi di industrie di produzione e lavorazione di manufatti.

Le sostanze organiche, a seconda delle proprietà chimico-fisiche, possono essere ritrovate nelle acque reflue, in soluzione o in sospensione, adsorbite sul particolato solido o co-precipitate al momento dell'immissione di specifici agenti flocculanti. Per quanto riguarda i PBDE, data la loro alta lipofilità, ci aspettiamo una maggiore presenza nella fase particolato e nei fanghi.

Nei seguenti paragrafi sono riportati i risultati relativi ai campioni di acqua in ingresso e in uscita, fase disciolta e fase particolato, degli impianti della Provincia di Varese di Sant'Antonino Ticino, Pravaccio e Cairate, degli impianti di Nosedo e San Rocco (Milano) e dell'impianto di Baciacavallo (Prato) e ai campioni di fango ispessito degli impianti menzionati e degli impianti di San Colombano (Firenze) e Calice (Pistoia), con lo scopo di individuare la presenza dei PBDE, la loro distribuzione e concentrazione nelle varie matrici.

Acqua in ingresso e in uscita

Sono stati prelevati campioni di acqua in ingresso e in uscita ai vari impianti di depurazione liquami, di ciascuno di questi sono stati determinati i livelli di concentrazione di PBDE sia nella fase disciolta che nella fase particolato.

Nei grafici 2.1.10, 2.1.11, 2.1.12, 2.1.13, 2.1.14 e 2.1.15 sono stati riportati i livelli delle concentrazioni dei congeneri di PBDE investigati nella fase disciolta e nella fase particolato dei vari campioni. Si può notare come i risultati mostrano la presenza di congeneri diversi nell'acqua in ingresso e in uscita agli impianti: la fase disciolta tende ad essere più ricca, rispetto alla fase particolato, dei congeneri a basso grado di bromurazione, viceversa, nella fase particolato è maggiore la presenza di composti più bromurati, infatti questi tendono maggiormente a legarsi al materiale particolato perché più lipofili. Nella fase disciolta, di quasi tutti i campioni, i congeneri presenti in concentrazioni maggiori sono i principali

costituenti della miscela Penta-BDE, il BDE-47, il BDE-99 e il BDE-100, mentre il BDE-153 e BDE-154 sono stati misurati solo in alcuni campioni. Il BDE-47, BDE-99 e BDE-100 sono stati rilevati nella fase particolato di tutti i campioni di acqua in ingresso agli impianti, ma con livelli di concentrazione bassi rispetto ad altri congeneri presenti. Il BDE-183, congenere più abbondante della miscela Octa-BDE, non è stato mai osservato nella fase disciolta dei campioni, mentre è stato determinato nella fase particolato di due campioni di acqua in ingresso agli impianti. Il BDE-209, rappresentante della miscela Deca-BDE, è stato misurato in tutti i campioni esaminati (fase disciolta e fase particolato, in ingresso e uscita) ed il suo contributo supera quello degli altri, a volte, di alcuni ordini di grandezza. La determinazione di congeneri ormai banditi nelle acque reflue potrebbe essere legata alla presenza in circolazione di prodotti additivati con queste miscele, che, durante il loro ciclo di vita, hanno rilasciato e continuano a rilasciare PBDE nell'ambiente. Inoltre, studi recenti (*Söderström et al., 2004; Gerecke et al., 2005*) hanno mostrato che i BDE-47, -99 e -100 sono tra i principali prodotti di degradazione del BDE-209, il quale, pertanto, durante i processi di trattamento delle acque reflue, può costituire una possibile sorgente per i PBDE a più basso grado di bromurazione.

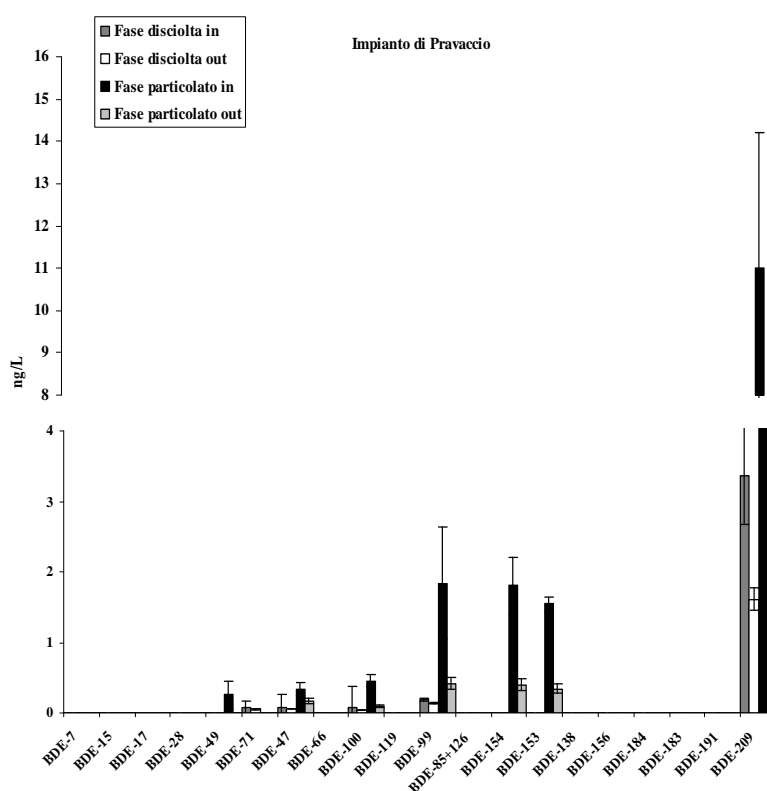


Figura 2.1.10 - Concentrazioni dei congeneri determinati per i campioni di acqua in ingresso e in uscita dell'impianto di Pravecchio (Varese)

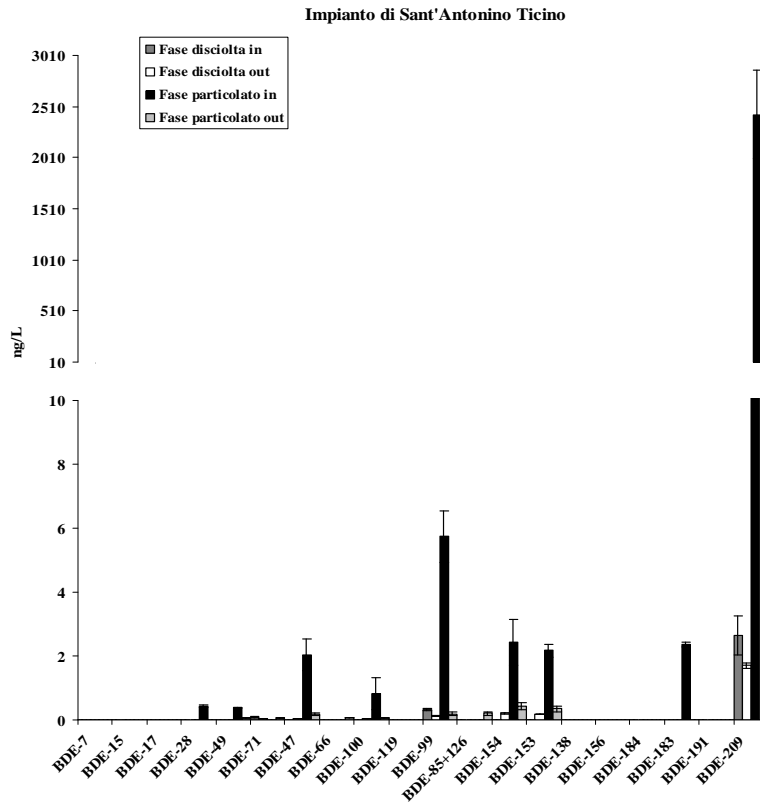


Figura 2.1.11 - Concentrazioni dei congeneri determinati per i campioni di acqua in ingresso e in uscita dell'impianto di Sant'Antonino Ticino (Varese).

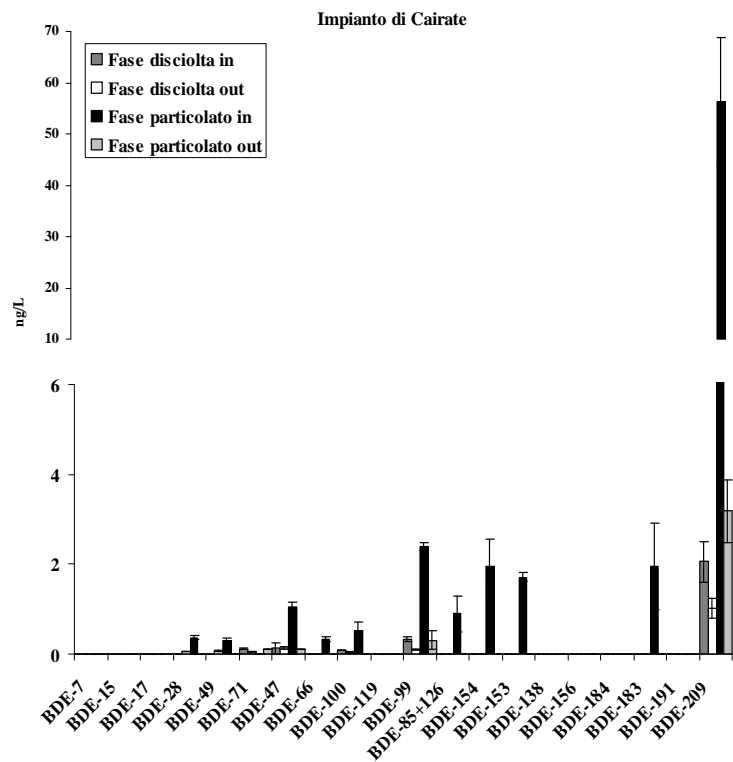


Figura 2.1.12 - Concentrazioni dei congeneri determinati per i campioni di acqua in ingresso e in uscita dell'impianto di Cairate (Varese)

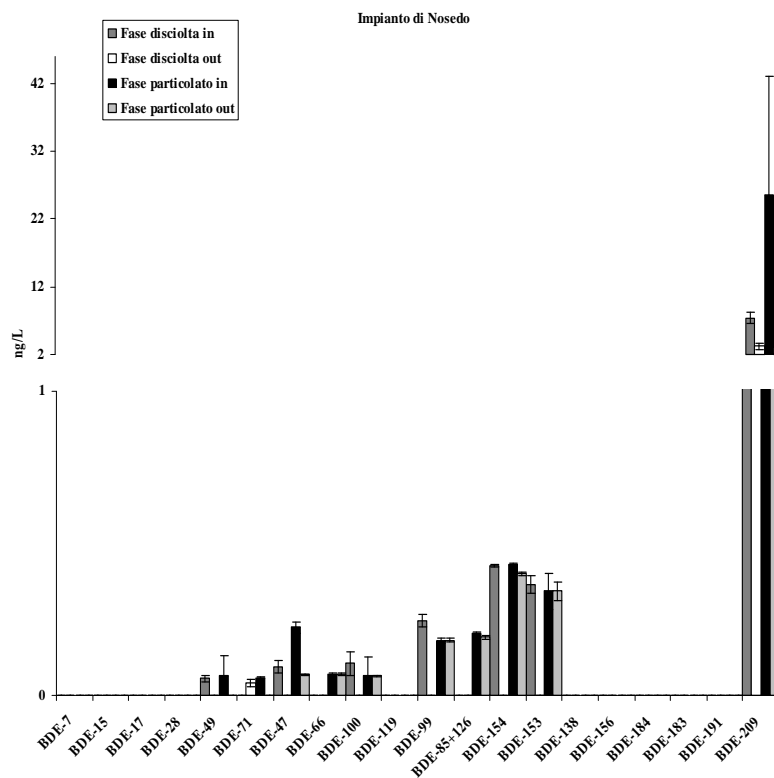


Figura 2.1.13 - Concentrazioni dei congeneri determinati per i campioni di acqua in ingresso e in uscita dell'impianto di Nosedo (Milano)

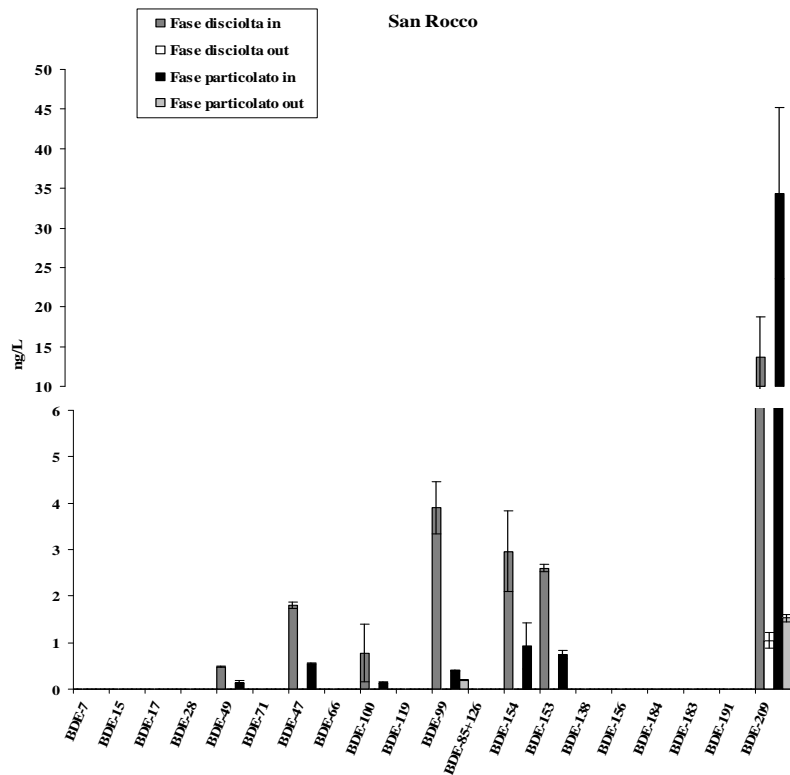


Figura 2.1.14 - Concentrazioni dei congeneri determinati per i campioni di acqua in ingresso e in uscita dell'impianto di San Rocco (Milano)

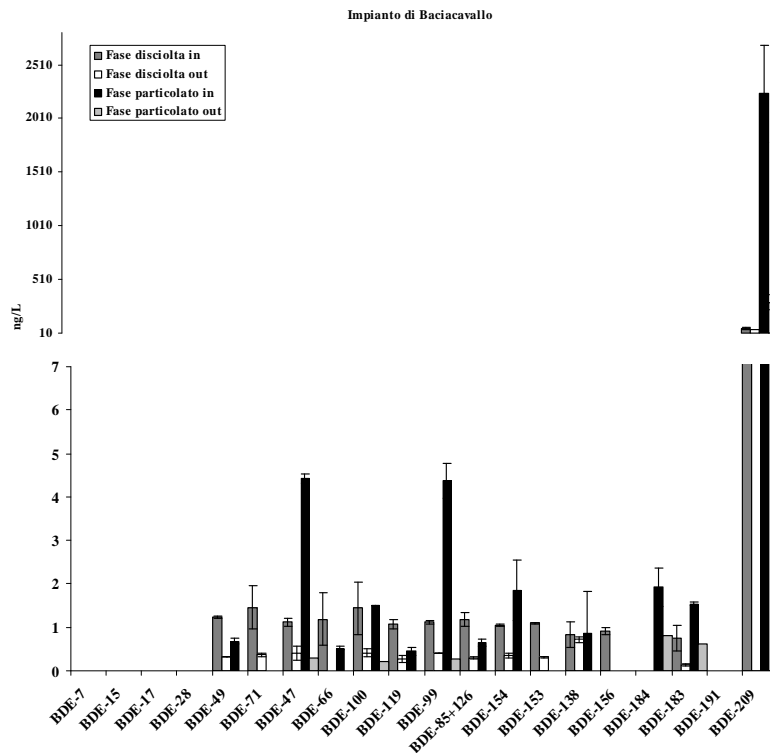


Figura 2.1.15 - Concentrazioni dei congeneri determinati per i campioni di acqua in ingresso e in uscita dell'impianto di Baciacavallo (Prato)

L'impianto di Nosedo, a differenza degli altri, presenta nel campione fase particolato dell'acqua in uscita, concentrazioni elevate dei congeneri BDE-99, BDE-100, BDE-153 e BDE-154, dello stesso ordine di grandezza di quelle del campione in entrata. Considerando che, in questo caso, l'utenza dell'impianto è decisamente elevata (1.250.000 abitanti equivalenti) e superiore a quella di tutti gli altri impianti presi in considerazione, si può ipotizzare che la minore efficacia del processo depurativo del suddetto impianto possa essere imputata all'ingente carico di refluo, che non consente un buon abbattimento dei PBDE.

In generale, per tutti gli impianti presi in considerazione, si osserva che i campioni di acqua in uscita (fase disciolta e fase particolato) presentano concentrazioni nettamente inferiori rispetto agli ingressi (abbattimento di PBDE che varia tra il 71% e il 98%), a dimostrazione di una certa efficacia del processo depurativo dei suddetti impianti nei confronti dei PBDE (vedi figura 2.1.16).

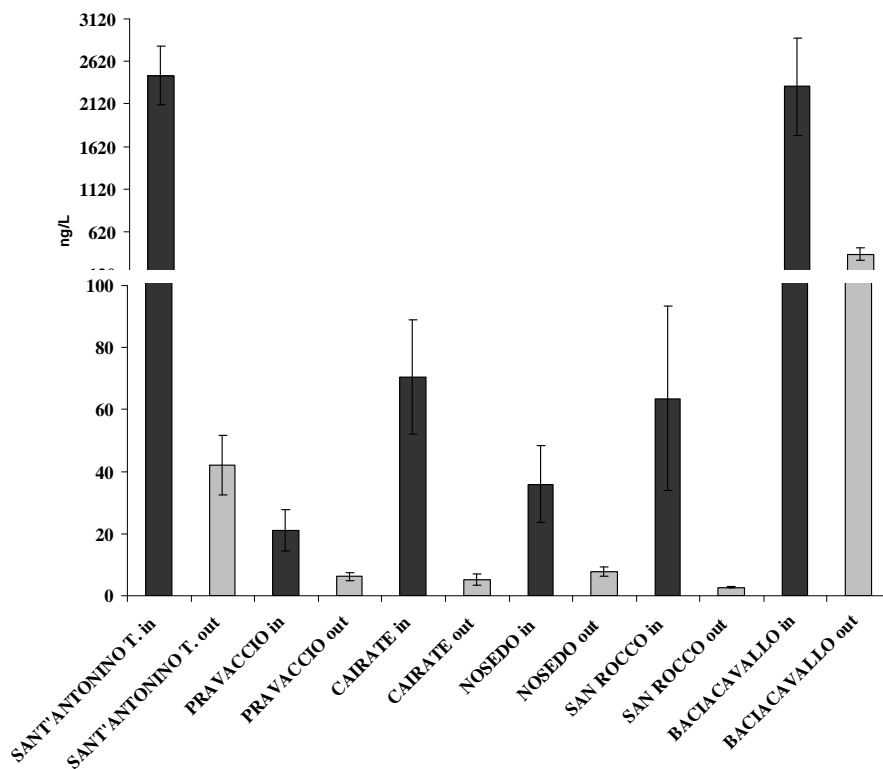


Figura 2.1.16 - Efficienza di abbattimento dei PBDE negli impianti

Ciò nonostante, la concentrazione risultante dalla somma dei congeneri costituenti la miscela Penta-BDE per l'acqua in uscita dai vari impianti (fase disciolta + fase particolato), risulta superiore al valore proposto dalla Comunità Europea, come livello di qualità, di 0,5 ng/L come media annuale per acque interne (vedi figura 2.1.7). Tale valore non rappresenta attualmente un limite di legge ma solo uno standard di qualità, introdotto con la proposta di direttiva 10790/07. Qualora tale valore venisse imposto come limite di legge, i processi di trattamento degli impianti da noi considerati (fatta eccezione per l'impianto di San Rocco) risulterebbero inadeguati a rispettare tale limite per i PBDE. Gli impianti che presentano valori più elevati di Penta-BDE misurate nelle acque in uscita sono Baciacavallo e Sant'Antonino Ticino, le cui concentrazioni sono $2,64 \pm 0,41$ e $1,77 \pm 0,52$ ng/L rispettivamente (vedi tab. 2.1.4); questi alti valori sono causati dalla tipologia di acque reflue trattate, ovvero scarichi industriali prevalentemente tessili.

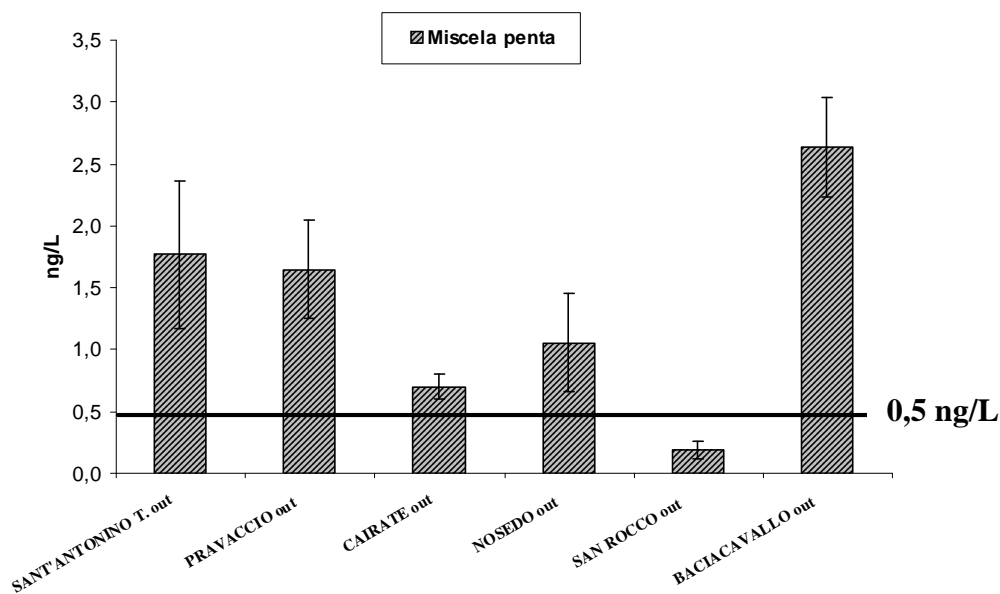


Figura 2.1.17 – Miscela Penta-BDE nelle acque in uscita agli impianti

Impianto	S.Antonino T.	Cairate	Pravaccio	Nosedo	San Rocco	Baciacavallo
Concentrazioni Penta-BDE (ng/L)	1,77	0,70	1,65	1,06	0,19	2,64

Tabella 2.1.4 – Miscela Penta-BDE nelle acque in uscita agli impianti

La concentrazione del BDE-209 è superiore alla concentrazione di tutti gli altri congeneri sia nei campioni (fase disciolta e fase particolato) in ingresso che in uscita dagli impianti di depurazione; il carattere particolarmente idrofobico di questo composto, superiore a quello di tutti gli altri PBDE, potrebbe spiegare la sua concentrazione di un ordine di grandezza superiore nella fase particolato rispetto alla fase disciolta.

I campioni acquosi in ingresso agli impianti di Baciacavallo e Sant'Antonino Ticino presentano, per il BDE-209, valori di concentrazione in fase particolato più elevati rispetto ai campioni prelevati presso gli altri impianti, 2449 ± 432 ng/L per Sant'Antonino T. e 2320 ± 456 ng/L per Baciacavallo, contro concentrazioni che variano da $1,53 \pm 0,06$ a 298 ± 72 ng/L per gli altri impianti esaminati; ciò potrebbe essere legato al fatto che i suddetti impianti raccolgono in larga parte acque di scarico provenienti da lavorazioni industriali, in particolar modo da quelle tessili come lava-tintorie e tinto-stamperie. Che il BDE-209 sia il congenero più abbondante trova

spiegazione nel fatto che la miscela Deca-BDE, di cui il BDE-209 è il principale componente, non solo è la più utilizzata sia in Europa che a livello mondiale (>80%) ma è inoltre andata a sostituire le miscele Penta-BDE ed Octa-BDE, messe al bando dal 2004 (vedi capitolo 1).

Nel grafico 2.1.18 viene messo in evidenza quanto alto sia il contributo del BDE-209 sul totale dei PBDE, infatti, in fase particolato rappresenta il $79,17 \pm 16,51\%$ del totale.

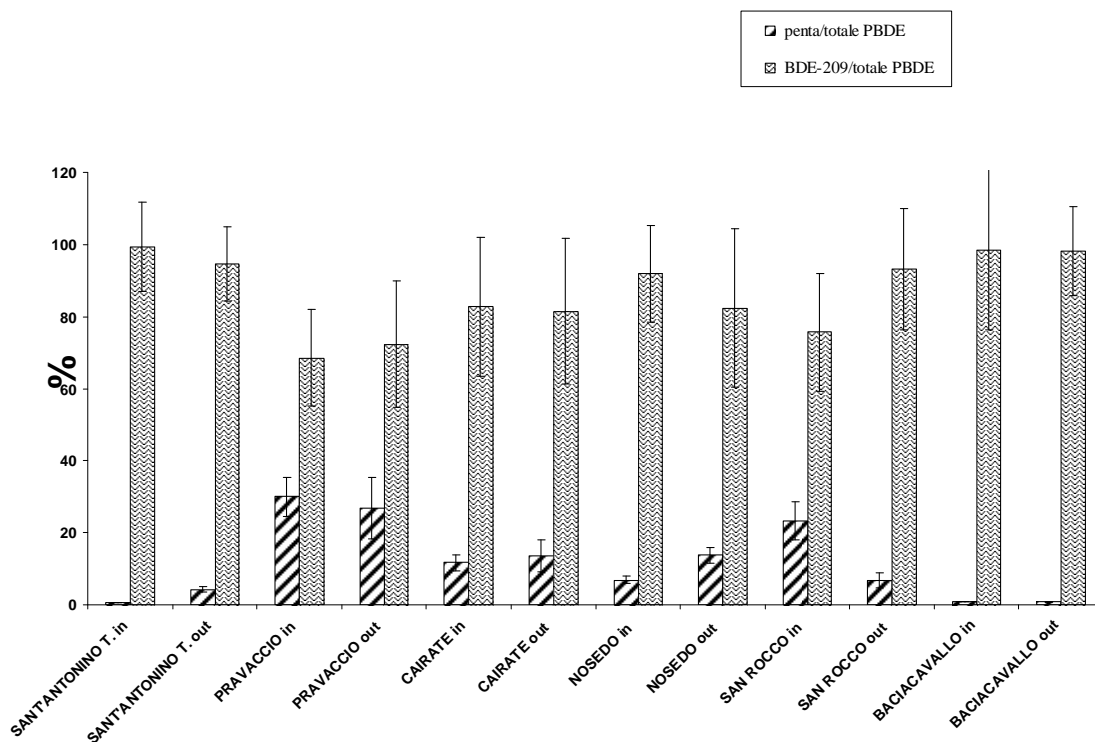


Figura 2.1.18 - Rapporti percentuali della concentrazione dei congeneri costituenti la miscela Penta-BDE e Deca-BDE sulla concentrazione totale dei PBDE per i campioni acquosi in ingresso e in uscita degli impianti considerati.

Nei grafici 2.1.19 e 2.1.20 si può osservare la distribuzione delle concentrazioni della miscela Penta-BDE, il BDE-209 e la somma totale di tutti i congeneri esaminati nella fase disciolta e particolato. La distribuzione dei PBDE tra fase disciolta e fase particolato è, quindi, tale che, per tutti gli impianti presi in esame, la maggior parte dei PBDE tende ad essere associata al materiale particolato, con un valore medio di $79,24 \pm 15,53\%$ rispetto ai PBDE totali.

Dati di letteratura (Oros D. R. et al., 2005; Streets S. S. et al., 2006; Cetin B. et al., 2007) confermano che la distribuzione dei PBDE tra le due fasi non è uniforme e dipende dal tempo di residenza del composto organico nell'acqua e da proprietà dell'acqua quali, ad esempio, il carico di particolato e il contenuto di materiale organico (DOC). Per quanto riguarda i campioni in ingresso agli impianti, la concentrazione totale dei PBDE presenti e la concentrazione dei

congeneri costituenti la miscela Penta-BDE risultano più elevate, in generale, nella fase particolato che nella fase disciolta, in accordo con le proprietà chimico-fisiche (coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, pressione di vapore, solubilità, etc...) della classe di inquinanti (unica eccezione è rappresentata dal campione prelevato presso l'impianto di San Rocco); per quanto riguarda i campioni in uscita non è possibile verificare questo stesso comportamento data l'esigua presenza di particolato (concentrazioni inferiori al LOD del metodo utilizzato).

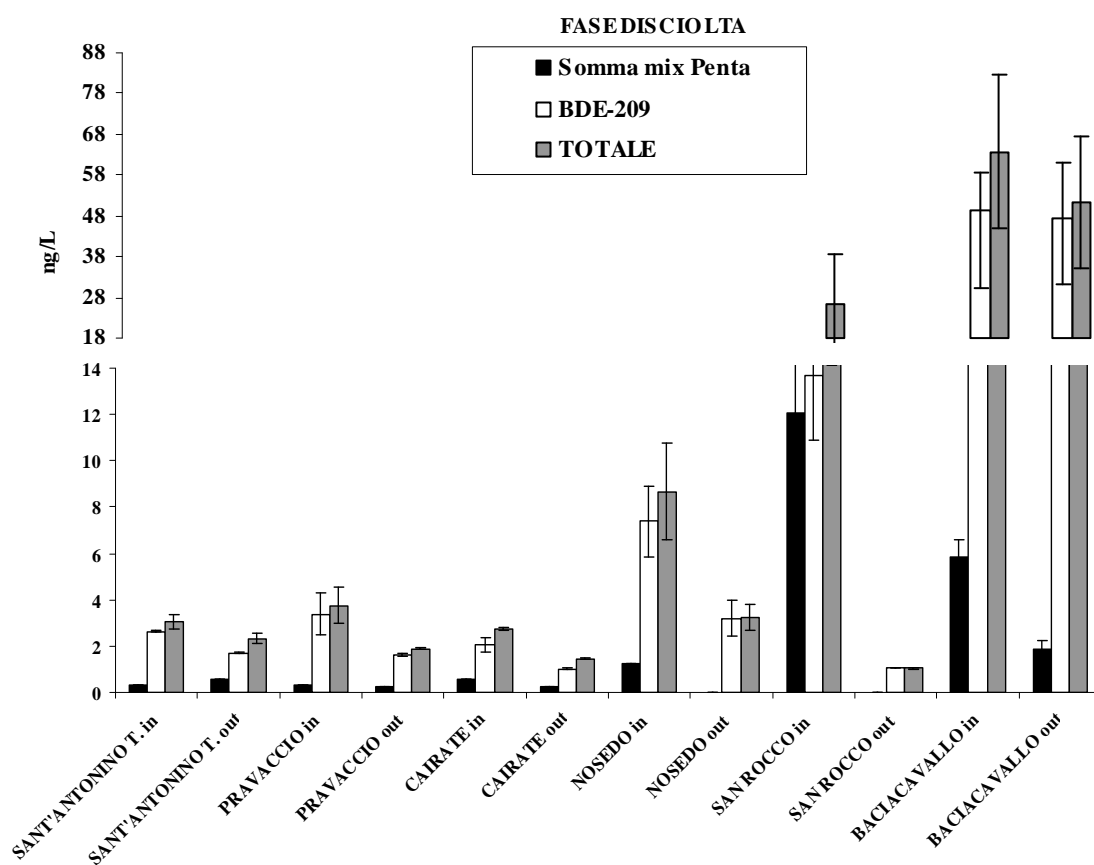


Figura 2.1.19 - Confronto tra la concentrazione della miscela Penta-BDE, BDE-209 e la somma totale dei PBDE nella fase disciolta

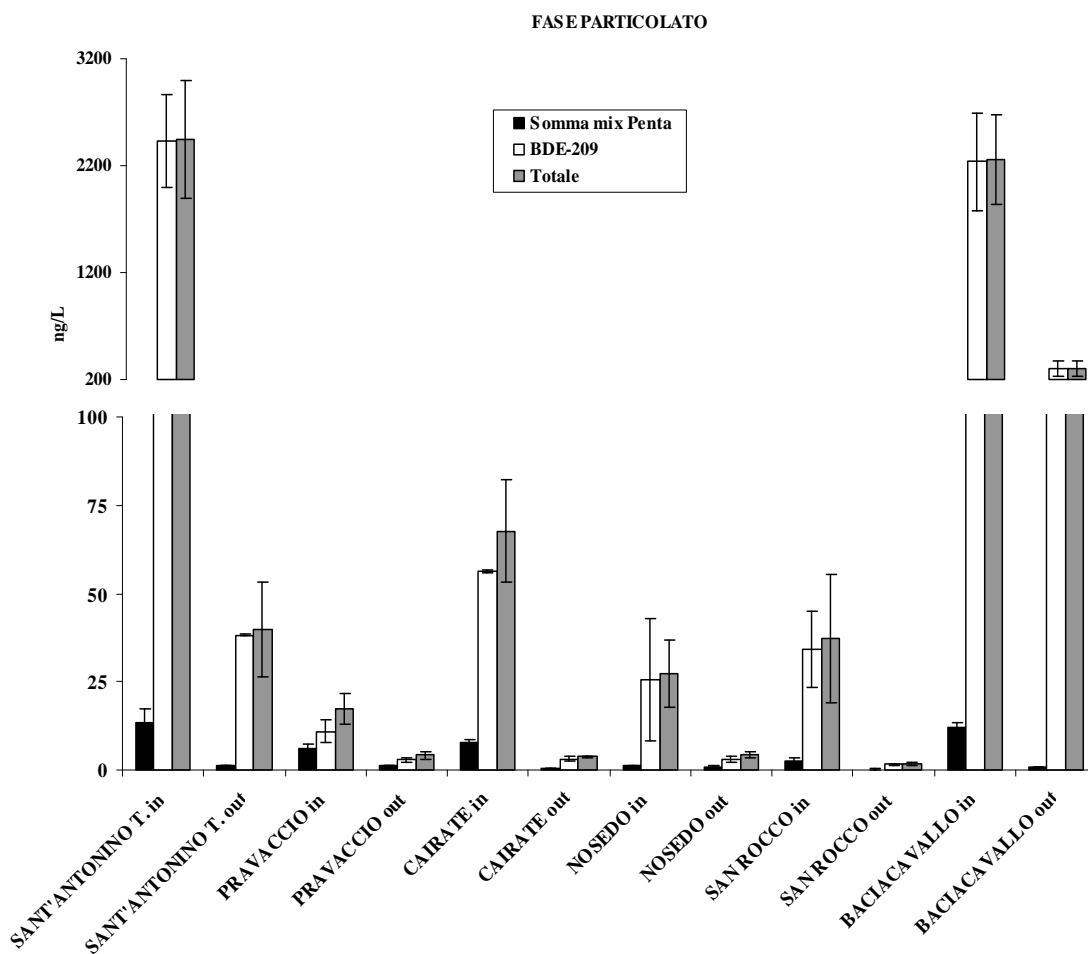


Figura 2.1.20 - Confronto tra la concentrazione della miscela Penta-BDE, BDE-209 e la somma totale dei PBDE nella fase particolato

I rapporti BDE-47/99 e BDE-99/100 nella miscela commerciale Penta-BDE, più precisamente la miscela Bromkal 70-5DE, la più utilizzata in Europa, sono rispettivamente 1 (Sjödin et al., 1998) e 0.19. Per valutare la possibilità di una debromurazione del BDE-209 durante il processo depurativo effettuato dagli impianti in esame, è stato calcolato per i campioni acquosi il rapporto tra le concentrazioni del BDE-47 e del BDE-99 e il rapporto tra le concentrazioni del BDE-99 e del BDE-100, con l'intento di verificare se tali rapporti fossero comparabili con quelli caratteristici della miscela Penta-BDE e se vi fosse una variazione passando dall'ingresso all'uscita.

In generale tali rapporti mostrano una certa variazione passando dall'ingresso all'uscita dell'impianto (vedi tabella 2.1.5), a indicare una certa influenza della degradazione del BDE-209 sulle concentrazioni dei congeneri BDE-47, BDE-99, BDE-100, che rappresentano i suoi prodotti di degradazione principali.

CAMPIONI	BDE-47/99	BDE-99/100
SANT'ANTONINO T. in	0,339	7,213
SANT'ANTONINO T. out	0,695	3,139
PRAVACCIO in	0,201	3,871
PRAVACCIO out	0,399	4,317
CAIRATE in	0,434	4,423
CAIRATE out	0,611	11,860
NOSEDO in	0,743	2,522
NOSEDO out	0,379	2,847
SAN ROCCO in	0,548	4,681
SAN ROCCO out	-	-
BACIACAVALLO in	1,009	1,867
BACIACAVALLO out	1,044	1,080

Tabella 2.1.5 - Rapporti tra le concentrazioni dei congeneri BDE-47/99 e dei congeneri BDE-99/100

È interessante confrontare le concentrazioni di PBDE determinate in questo studio con quelle presenti in letteratura: gli studi condotti su questo tipo di matrice sono ancora pochi a causa dell'interesse solo recente della comunità scientifica e degli organi legislativi nei confronti di questa classe di contaminanti, spinto anche dai recenti studi tossicologici che hanno dimostrato l'evidente tossicità di alcuni congeneri e la potenziale tossicità di altri.

Nella tabella 2.1.6 sono riportate le concentrazioni dei cinque maggiori congeneri costituenti la miscela Penta-BDE e del BDE-209 presenti nell'acqua in uscita di impianti di depurazione liquami, determinati in studi condotti in varie zone del mondo ed in questo lavoro di tesi. Confrontando i nostri risultati con i dati riportati nei diversi studi si nota come, nel caso della miscela Penta-BDE, le concentrazioni trovate siano dello stesso ordine di grandezza indipendentemente dalle zone prese in esame; vi sono, invece, differenze per quel che riguarda

il BDE-209. Il diverso livello di concentrazione sembra molto influenzato dal tipo di refluo trattato da ciascun impianto.

Concentrazione (ng/L) dei PBDE in acqua in uscita da impianti di depurazione								
Luogo	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	Penta-BDE	BDE-209	Bibliografia
Roskilde (Danimarca)	0,42	0,25	0,06	<0,05	0,02	0,8	<1,4	Christensen J. H. (2003)
Palo Alto (California)	10,4	11,2	1,98	0,98	0,77	25,33	1,73	North K. D. (2004)
S. Antonino T. (Va)	0,22	0,31	0,10	0,51	0,62	1,77	39,92	Il presente studio (2010)
Cairate (Va)	0,25	0,25	0,03	bdl	bdl	0,70	4,21	
Pravaccio (Va)	0,22	0,56	0,13	0,35	0,39	1,65	4,44	
Nosedo (Mi)	0,07	0,18	0,06	0,34	0,40	1,06	3,20	
San Rocco (Mi)	bdl	0,19	bdl	bdl	bdl	0,19	1,57	
Baciacavallo (Po)	0,70	0,67	0,62	0,31	0,34	4,06	345,84	
bdl= below detection limit								

Tabella 2.1.6 - Confronto tra le concentrazioni dei PBDE riportati per campioni di acqua di scarico in uscita da impianti di depurazione relativi ad altri studi

Fanghi

I campioni di fango analizzati in questo studio sono campioni di fango ispessito, ottenuto come sottoprodotto del processo depurativo di impianti a fanghi attivi, e sottoposto al processo di ispessimento che ne riduce il volume, eliminando parte dell'acqua contenuta.

I fanghi di tutti gli impianti considerati presentano alte concentrazioni di PBDE, in accordo con le proprietà chimico-fisiche di tale classe di composti che, essendo caratterizzati da elevata idrofobicità e bassa solubilità in acqua, tendono ad adsorbirsi sul materiale in sospensione, che poi è separato dall'acqua, alla fine del processo depurativo. Pertanto i fanghi, all'interno di un impianto di depurazione liquami, rappresentano la matrice in cui tendono maggiormente a concentrarsi i PBDE.

Il più abbondante in assoluto è il congenere BDE-209, vedi figura 2.1.21, la sua concentrazione varia da 287 ± 57 ng/g per l'impianto di Nosedo a 26926 ± 5784 ng/g per l'impianto di Baciacavallo. Altri congeneri presenti sono il BDE-47, il BDE-99, il BDE-100, il BDE-153, il BDE-154 e il BDE-183, quindi essenzialmente i congeneri costituenti la miscela Penta- ed Octa-BDE.

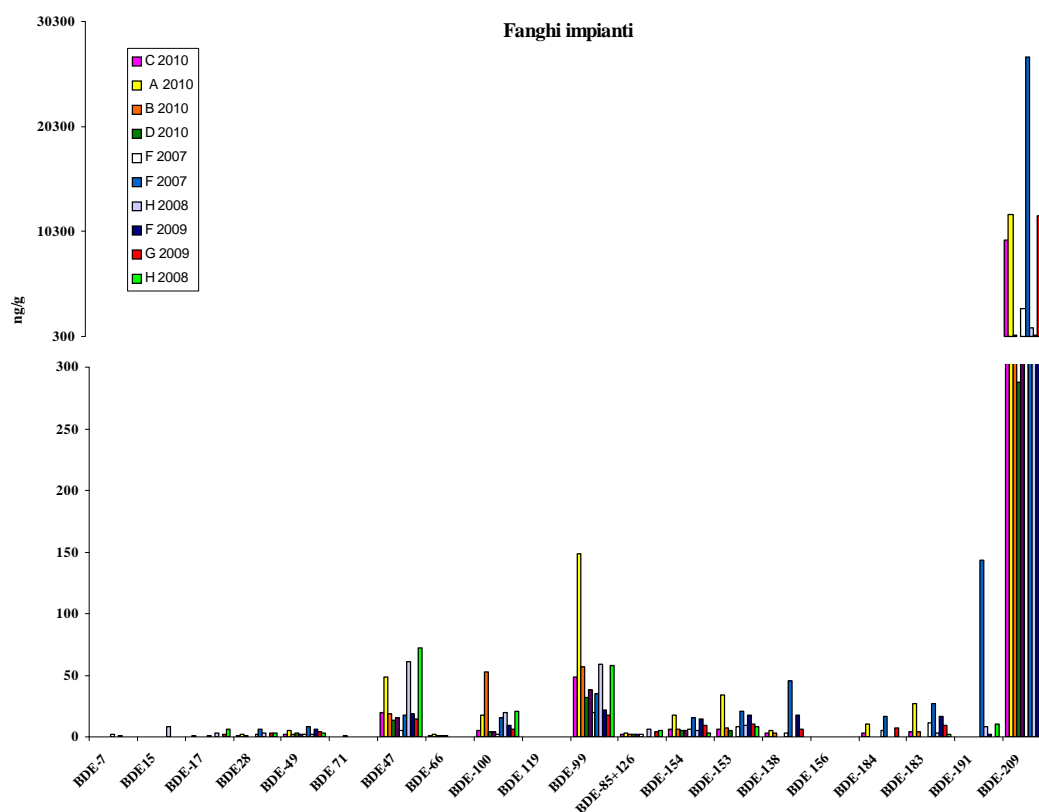


Figura 2.1.21 - Concentrazioni dei congeneri nei campioni di fango analizzati

Molti sono i fattori che possono influenzare la concentrazione di microinquinanti nei liquami trattati da un dato impianto: lo stile di vita dei cittadini, la tipologia delle industrie presenti nell'area di utenza dell'impianto, l'intensità dell'attività agricola svolta sul territorio, la densità e lo stato socio-economico della popolazione, etc. Proprio per questo non è possibile trovare una relazione tra le dimensioni dell'impianto di depurazione (numero di abitanti equivalenti) e la concentrazione dei PBDE determinati.

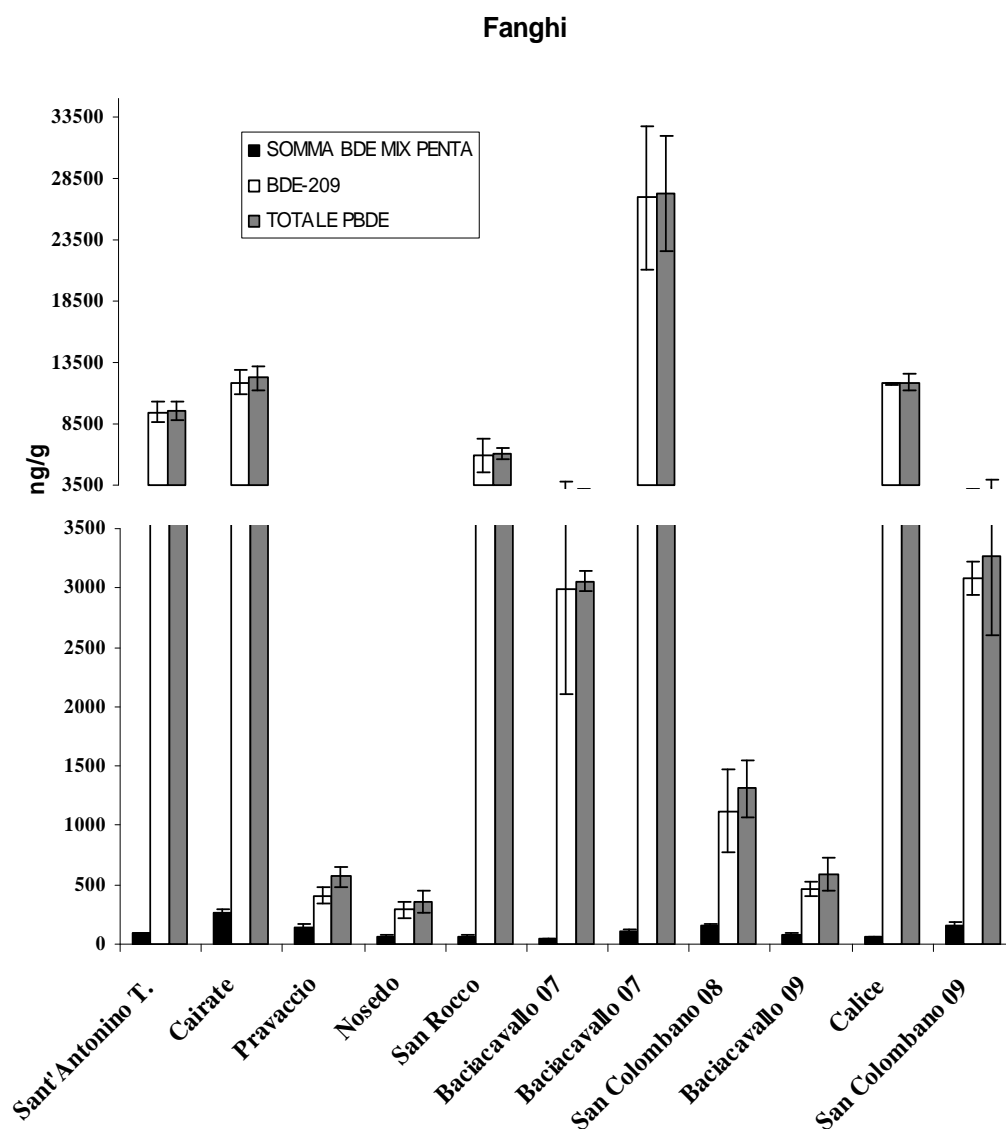


Figura 2.1.21 - Confronto tra la concentrazione della miscela Penta-BDE, BDE-209 e la concentrazione totale dei PBDE per i fanghi dei vari impianti

E' interessante confrontare le concentrazioni di PBDE determinate in questo studio con quelle presenti in letteratura. In tabella 2.1.7 sono riportate le concentrazioni del deca-BDE, dei cinque maggiori congeneri della miscela Penta-BDE e la loro somma, determinate su campioni di fango in studi condotti nel mondo e in questo lavoro di tesi. I risultati mostrano concentrazioni

molto diverse a seconda della regione in cui l'impianto è situato, le tipologie degli scarichi dipendono dalle diverse attività presenti sul territorio.

Concentrazione (ng/g dry weight) per i PBDE in campioni di fanghi di depurazione								
Luogo	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	Penta-BDE	BDE-209	Bibliografia
Palo Alto (California)	77 - 778	894-973	158-172	83-91	61-72	1.918-2.086	1.010-1.440	North K. D. (2004)
USA	359 - 754	931-1157	89-255	56-199	58-172	1.100-2.290	85-4.890	Hale R.C. et al. (2001)
Stoccolma (Svezia)	39 - 92	48-120	11-28	nd	nd	98-239	140-350	Sellstrom U. et al. (1999)
Svezia	<2 - 80	<2-104	<2-25	1,2-7	1,1-5,8	9,3-223,5	8,5-275	Hellstrom T. (2000)
Germania	14 - 115	9-124	1-25	1-15	1-15	26-294	97-2217	Knoth W. et al. (2007)
Spagna	38,5	34,5	7,7	16,4	10,4	114,2	785-18.032	Fabrellas B. et al.(2004)
Bjergmarken (Danimarca)	96,8	86,2	19,10	7,8	6,1	216,0	248	Christensen J. H. et al. (2003)
Cina	0,4 - 58,7	<dl-69,7	<dl-18,4	<dl-30,2	<dl-9,6	0,4-186,6	<dl-1.108,7	Wang Y. et al. (2007)
Kuwait	0,2 - 7,8	0,4-14,7	0,06-2,3	0,04-1,4	0,06-1,8	0,8-28	4,8-1.595	Gevao et al. (2007)
Sant'Antonino T. (Va)	19,18	48,57	5,54	6,06	5,86	85,20	9.646,96	Il presente studio (2010)
Cairate (Va)	48,36	148,09	17,11	33,59	17,55	264,71	11.892,28	
Pravaccio (Va)	18,60	57,14	52,62	7,39	5,93	141,68	410,37	
Nosedo (Mi)	13,08	32,30	4,46	4,83	4,95	59,61	287,23	
San Rocco (Mi)	15,68	38,21	4,36	< dl	5,32	63,57	5.955,35	
Baciacavallo (Po)	5,57-18,06	19,96-35,42	2,02-15,34	8-20,33	6,16-15,74	41,70-104,62	2.985,25-26.926,13	
Calice (Pt)	14,37	17,59	6,68	10,11	8,95	57,69	11.792,92	
San Colombano (Fi)	60,8-71,97	57,71-58,82	19,9-20,78	8,61-9,10	3,57-4,65	153,3-162,35	465,96-3.081,34	

Tabella 2.1.7 - Concentrazioni della miscela Penta-BDE, somma totale dei congeneri e del BDE-209 relativi ad altri studi

Ad esempio, le elevate concentrazioni di PBDE determinate a Palo Alto (USA) possono essere giustificate dalla presenza di una intensa attività industriale, tra cui ha un posto di rilievo l'industria della Hewlett-Packard nota per la produzione di computer, stampanti, macchine fotografiche, circuiti elettrici etc.

Sellstrom et al.(1999) riporta le concentrazioni dei PBDE in fanghi di tre impianti situati in Svezia determinando, nel caso della miscela Penta-BDE, valori compresi tra 98 e 239 ng/g e per il BDE-209 concentrazioni variabili tra 140 e 350 ng/g, mentre lo studio effettuato da North (2004) in California riporta valori compresi tra 1.918 e 2.086 ng/g per la miscela Penta-BDE e tra 1.010 e 1.440 ng/g per il BDE-209.

Per quanto riguarda i risultati conseguiti in questo studio, i valori rientrano nel range degli Stati Europei.

La somma dei congeneri Penta-BDE nei nostri campioni varia tra $59,61 \pm 12,30$ e $264,71 \pm 34,20$ ng/g, valori comparabili con quelli determinati nei Paesi europei, in linea col fatto che l'utilizzo di questi composti e la loro regolamentazione è simile in tutta Europa. La concentrazione del BDE-209 varia in range (287 ± 57 - 26926 ± 5784 ng/g) che presenta valori superiori, nella maggior parte dei casi, a quelli ottenuti negli altri Paesi Europei. Bisogna ricordare che gli impianti da noi presi in esame sono caratterizzati prevalentemente da un refluo misto civile e industriale, dove la percentuale dell'industriale pesa in maniera variabile e consistente sul carico organico dell'impianto. Non dobbiamo poi dimenticare che, non essendoci alcuna regolamentazione relativa al BDE-209, il suo utilizzo nei diversi Paesi è completamente arbitrario.

Confermata la presenza dei PBDE nelle acque reflue in uscita agli impianti di depurazione liquami e nei prodotti provenienti dai processi di purificazione, ovvero i fanghi, e accertato che i livelli delle concentrazioni nelle acque superano gli standard di qualità di 0,5 ng/L, suggerito dalla Comunità Europea, dobbiamo riflettere sulle conseguenze intrinseche di questi risultati.

Ad oggi, non essendo stati proposti dalla Comunità Europea livelli di qualità per i PBDE nei fanghi e nei suoli, i fanghi di depurazione possono essere smaltiti in agricoltura, come ammendanti, senza un controllo delle concentrazioni dei PBDE presenti e quindi senza preoccupazione di una contaminazione diffusa dei suoli da parte di questa classe di inquinanti.

Per quanto riguarda le acque in uscita da impianti di depurazione, queste vengono o utilizzate per l'irrigazione delle campagne oppure riversate nei bacini idrici prossimi agli impianti. Quindi, anche le acque, contribuiscono, seppur in minor parte date le concentrazioni inferiori determinate in tale matrice, a contaminare il suolo e i bacini idrici recettori che, qualora abbiano regimi torrentizi, possono non essere in grado di effettuare la diluizione necessaria ad abbattere il rischio sanitario per il biota e, attraverso la catena alimentare, anche per l'uomo.

2.2 - Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): una nuova metodica per la determinazione di PBDE in campioni di fango

Le analisi ambientali vengono effettuate solitamente con tecniche classiche di laboratorio come GC, HPLC, e le loro tecniche ipenate, strumenti molto sensibili e altamente selettivi che ci garantiscono analisi sicure e affidabili. Questi strumenti, però, per essere efficienti hanno bisogno di una particolare manutenzione, quindi alti costi di gestione, metodiche estrattive di preparazione del campione molto lunghe e operatori esperti. Nelle analisi ambientali non sempre è necessario utilizzare tecniche sofisticate in grado di determinare la concentrazione di specifici congeneri di una classe di composti organici, ma è sufficiente determinare la concentrazione totale di tali composti, al fine di verificare se la concentrazione contenuta in un campione rientra nei limiti legislativi in vigore. In questi casi è possibile utilizzare tecniche analitiche, come ad esempio i saggi immunochimici, che richiedono minori costi di manutenzione e utilizzo, minore specificità e permettono di avere dei valori di concentrazione in tempi brevi.

In questo lavoro di tesi verifichiamo la possibilità di utilizzare un saggio immunochimico come il test ELISA per la determinazione della concentrazione totale dei PBDE in campioni di fanghi prelevati all'interno di vari impianti di depurazione acque reflue, in quanto i gestori di tali impianti hanno la necessità di far svolgere le analisi a personale spesso non specializzato e ricevere in tempi brevi un valore di concentrazione al fine di decidere il destino finale del fango (incenerimento, utilizzo come ammendante, etc).

I saggi immunochimici sono presenti sul mercato in formato di kit; tra i primi analiti per cui sono stati sviluppati i kit di analisi ricordiamo il benzo-a-pirene (*Kado & Wei, 1978*), l'atrazina e l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (*Witmann et al., 1996*). Recentemente sono stati messi sul mercato kit per test ELISA per la determinazione a livello di tracce anche per alcuni pesticidi come carbofuran, carbaryl, aldicarb, alaclor. Recentemente è stato sviluppato anche un kit ELISA per i PBDE (*Kit Abraxis*); quest'ultimo è stato progettato per l'analisi su matrici come l'acqua, il suolo, pesci e il latte materno (*Shelver et al., 2008*), ed è stato testato nel nostro laboratorio su campioni di fango provenienti dagli otto impianti di depurazione liquami citati nel capitolo precedente (vedi capitolo 2.1). Gli stessi campioni sono già stati sottoposti ad analisi gas-cromatografica (GC-NCI-MS), per cui sarà possibile confrontare i risultati ottenuti con le due diverse tecniche e verificare la possibilità di utilizzare il test ELISA come analisi di screening per avere la concentrazione totale dei PBDE nei campioni analizzati .

2.2.1 - Cenni sulla reazione antigene-anticorpo

Le reazioni antigene-anticorpo sono alla base del sistema di difesa immunitario di un organismo. La risposta immunitaria rappresenta una componente di un sistema, in cui numerose cellule e molecole agiscono in maniera concertata in modo da garantire la difesa dell'ospite nei confronti degli agenti riconosciuti come estranei. Gli elementi cellulari essenziali del sistema immunitario animale sono i linfociti T e B, che si originano per differenziazione dalle cellule staminali presenti nel midollo osseo.

Gli *antigeni* sono sostanze estranee all'organismo capaci di indurre, una volta introdotte in esso, una risposta immunitaria. Si tratta in genere di molecole proteiche o glicoproteiche e carboidrati, libere o associate a virus, a membrane batteriche o cellulari. Di solito solo una piccola parte della molecola antigenica viene riconosciuta dall'anticorpo, e tale parte è detta *determinante* o *epitopo*; la restante parte della molecola, che funziona, quindi, solo come "trasportatore", è detta *aptene*. Una molecola antigenica possiede per lo più diversi determinanti.

Gli *anticorpi* o *immunoglobuline* (Ig) sono glicoproteine (gamma-globuline) presenti nel plasma sanguigno o sulle membrane dei linfociti, con una struttura molecolare comune: quattro catene polipeptidiche legate ad un componente glucidico. La parte proteica è costituita da due catene leggere (L) identiche fra loro, e da due catene pesanti (H) pure identiche fra loro. Le molecole degli anticorpi sono tutte uguali fra loro, tranne che per i carboidrati cui sono legate e, soprattutto, per una piccola regione presente sia nelle catene L che nelle H, detta regione variabile. È a livello di questa porzione variabile che avviene il legame con l'epitopo dell'antigene in modo altamente specifico.

Gli anticorpi si suddividono in cinque classi, diverse tra loro, per la componente polisaccaridica: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD e tutte si trovano in varia proporzione nel sangue e sono secrete da plasmacellule (*Castano P. et al., 1999*).

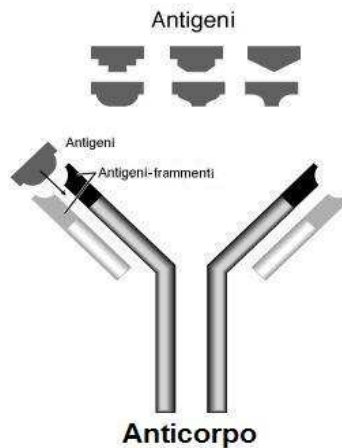


Figura 2.2.1 - Struttura di un anticorpo

La caratteristica forma a Y degli anticorpi si deve alla presenza di ponti disolfuro, che legano (in numero variabile da 3 a 14, a seconda della classe di immunoglobuline) le varie catene in modo tale che le due catene pesanti tra loro affiancate costituiscano, con la loro porzione carbossiterminale, il tronco della Y. I bracci della Y sono invece formati dall'appaiamento dell'estremità amminoterminale di una catena pesante con una catena leggera. Essendo la reazione Ag-Ab reversibile, è da escludere un tipo di interazione covalente. Infatti le interazioni che permettono questo riconoscimento molecolare sono essenzialmente le forze di Coulomb, le forze di Van der Waals ed i legami ad idrogeno.

I saggi immunochimici sfruttano la reazione di riconoscimento molecolare antigene-anticorpo, per l'identificazione di una molecola contro la quale possa essere prodotto un anticorpo. Grazie alla disponibilità crescente di anticorpi mono e policlonali, questo tipo di tecnica presenta un'alta sensibilità e selettività nell'associazione Ag-Ab, permettendo il riconoscimento dell'analita in tracce anche in matrici complesse.

Il costo di questo tipo di saggi è relativamente basso, se confrontato con le usuali tecniche analitiche, ma il grande vantaggio dei saggi immunochimici è che possono essere effettuati su campo e, quindi, impiegati come metodi di screening preliminare.

Generalmente gli immunosaggi vengono condotti utilizzando una fase solida su cui l'antigene o l'anticorpo viene ancorato.

Dal momento che lo scopo dei saggi immunochimici è quello di determinare la presenza e la concentrazione di uno dei due reagenti (Ag o Ab), è necessario disporre di un mezzo per valutare l'avvenuta reazione di riconoscimento molecolare. Per questo si usano dei marcatori, ossia molecole con opportune caratteristiche chimico-fisiche che legate all'antigene o all'anticorpo permettono l'identificazione analitica del complesso. Possono essere a questo scopo utilizzati isotopi radioattivi (tecnica RIA, Radio Immunologic Assay) (*Karmatschek et*

al., 1997; *Kertetz et al.* 1998), oppure enzimi (tecnica ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Grazie ai numerosi vantaggi dei marcatori enzimatici a fronte di quelli radioattivi, le tecniche immunoenzimatiche sono, senza dubbio, più diffuse delle radioimmunologiche.

I saggi immunochimici possono essere di tipo competitivo e non competitivo. La scelta del tipo di saggio da utilizzare è legata alle dimensioni delle molecole da analizzare: per la determinazione di analiti a basso peso molecolare, i saggi sono normalmente del formato ELISA (saggi di tipo competitivo), con limiti di rilevabilità in condizioni ottimizzate dell'ordine dei ppb-ppt. Pertanto quando applicati a matrici reali, si osservano LOD dell'ordine dei ppb oppure è necessario ricorrere a pre-trattamenti del campione. Un miglioramento significativo del limite di rilevabilità dei saggi immunochimici può essere ottenuto utilizzando un formato di tipo non-competitivo. Questo formato è potenzialmente molto più sensibile del formato competitivo (LOD inferiore di uno-due ordini di grandezza), poiché nel saggio non competitivo si ha la misura di un segnale che è direttamente proporzionale alla concentrazione di analita, mentre nel saggio di tipo competitivo si osserva un segnale inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita. Tuttavia, il modello classico di saggio non-competitivo non può essere applicato ad analiti a basso peso molecolare, dato che richiede il legame simultaneo di due anticorpi che risulta impossibile per molecole di piccola dimensione.

Il saggio di tipo competitivo può essere diretto o indiretto. Nel saggio di tipo *competitivo indiretto* l'antigene opportunamente modificato, viene immobilizzato su una fase solida (pozzetto della piastra) e l'anticorpo, se presente, si legherà all'antigene. La reazione di legame tra l'anticorpo e l'antigene immobilizzato può essere rilevata tramite un anticorpo secondario marcato, specifico per il primo.

Nel saggio *competitivo diretto*, invece, la fase solida viene modificata immobilizzando direttamente l'anticorpo e facendo avvenire la competizione tra l'antigene in soluzione e lo stesso antigene marcato (*Franek et al.*, 1997).

In entrambi i casi, il reagente che è stato marcato viene utilizzato per quantificare la reazione di affinità Ag-Ab. Nei test di tipo competitivo il segnale ottenuto è inversamente proporzionale alla quantità di analita presente nel campione, poiché più grande è la concentrazione di analita nel campione, più piccola sarà la quantità di reattivo marcato che si lega.

I saggi di tipo non competitivo (talvolta denominati "a sandwich") possono, invece, essere utilizzati con analiti di grandi dimensioni che presentano due o più determinanti antigenici e che sono, quindi, in grado di interagire con più anticorpi contemporaneamente. In questi saggi l'obiettivo è realizzare sulla fase solida una sequenza Ab-Ag-Ab (*Crowter*, 1995). Per

raggiungere questo scopo viene immobilizzato un primo anticorpo, l'antigene ed un secondo anticorpo marcato, specifico per un secondo determinante antigenico; una volta avvenuta la seconda reazione di affinità, viene rilevata la quantità di complesso sandwich formatosi.

I vantaggi della tecnica a sandwich sono l'elevata sensibilità (pg/L) ed una maggiore specificità legata all'utilizzazione di due anticorpi diversi (Davies, 1994); mentre gli svantaggi sono legati per lo più a tempi maggiori rispetto ad un saggio non competitivo ed al fatto che, con questo metodo, possono essere determinati pochi analiti .

2.2.2 - Campionamento e trattamento dei campioni

I campioni che sono stati sottoposti ad analisi immunoenzimatica, mediante test ELISA, sono i campioni di fango ispessito provenienti dagli impianti di depurazione a differente tipologia di refluo (misto industriale-civile o civile) situati nella provincia di Varese (Pravaccio, Cairate e Sant'Antonino Ticino), dagli impianti, localizzati in provincia di Milano (Nosedo e San Rocco), campionati tra il 2009 e il 2010, e dagli impianti toscani di Baciacavallo (PO), Calice (PT) e San Colombano (FI), campionati tra il 2007 e il 2009. I campioni di fango hanno subito due metodiche di estrazione specifiche per le due tecniche analitiche prese in esame, ovvero il test ELISA e GC-MS. Per quanto riguarda il trattamento dei campioni precedente all'analisi gascromatografica, questa è descritta nel capitolo 2.1; vado adesso a descrivere le procedure di preparazione del campione all'analisi immunoenzimatica.

L'estrazione dei campioni di fango da sottoporre al test ELISA è stata effettuata mediante il metodo proposto da Shelver et al. (2008) con alcune modifiche (ad es. quantità di reagenti, numero di estrazioni, etc.) in quanto lo studio citato prevedeva l'estrazione di suoli.

Un grammo di campione, precedentemente liofilizzato, e 1-2 g di Na₂SO₄ anidro sono stati miscelati ed addizionati di 6 mL di una miscela esano-acetone 4:1 (v/v). Il tutto è stato sottoposto ad agitazione magnetica per 10 min con Vortex e, successivamente, centrifugato per 5 minuti a 2500 giri. L'estratto ha, poi, subito numerosi lavaggi con 2,4 mL di H₂SO₄ 98% fino a quando la fase acida è diventata incolore (vedi figura 2.2.2); la procedura di lavaggio ha previsto agitazione con Vortex per 3 minuti e tempo di separazione delle due fasi, acida e organica, di 30 minuti. La fase organica è stata raccolta portata a secco sotto flusso di azoto, il residuo è stato, dunque, ridisciolti in 1 mL di DMSO. Il campione è stato, quindi, diluito 50 volte in una soluzione di MeOH al 50%, per essere sottoposto al test ELISA

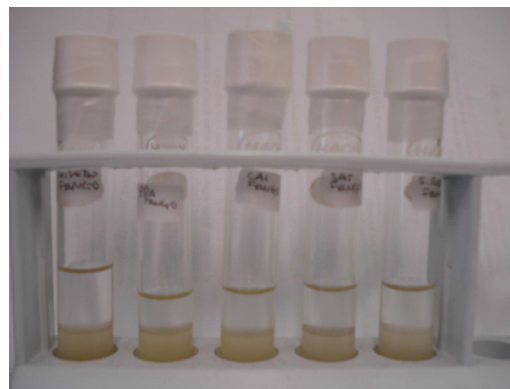
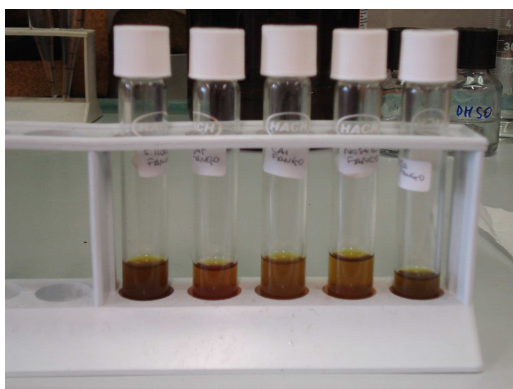


Figura 2.2.2 - Estratto dei campioni di fango prima e dopo numerosi lavaggi con acido solforico

2.2.3 - Procedura per il test ELISA

Nel saggio ELISA specifico per i PBDE, il campione in esame è stato incubato con particelle magnetiche funzionalizzate con anticorpi specifici anti-PBDE seguita dall'aggiunta di PBDE marcati con un enzima (perossidasi). Sia i PBDE presenti nel campione che quelli marcati competono per lo specifico sito dell'anticorpo immobilizzato sulle particelle magnetiche. Dopo un tempo di incubazione di circa 20 min è stato applicato un campo magnetico alla sospensione delle particelle (poste in un apposito vial a contatto con un magnete) che permette ai reagenti non legati di separarsi. Successivamente le particelle sono lavate con l'apposita soluzione di lavaggio.

La presenza di PBDE viene rivelata aggiungendo il *substrato* per l'enzima marcatore (H_2O_2) ed il *co-substrato* (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), che ne determina lo sviluppo del colore. All'aggiunta di questi, i PBDE marcati con l'enzima che si sono legati con l'anticorpo sono, infatti, rivelati con lo sviluppo di una colorazione. Dopo venti minuti, necessari per lo sviluppo del colore, la reazione viene fermata e stabilizzata con l'aggiunta di acido (H_2SO_4 0.5%). La determinazione dei PBDE è stata, infine, eseguita attraverso misure spettrofotometriche a 450 nm: lo sviluppo del colore, e quindi l'assorbanza, è inversamente proporzionale alla concentrazione dei PBDE nel campione.

La lettura spettrofotometrica ci ha fornito, per i campioni analizzati, valori di Assorbanza, che sono stati convertiti in valori di concentrazione per mezzo di una retta di taratura, ottenuta operando la regressione lineare dei punti standard del $\log B_x/B_0\%$ contro \log della

concentrazione per un set di soluzioni standard, incluse nel kit, aventi concentrazione di 0 ppb, 0,025 ppb, 0,05 ppb, 0,1 ppb, 0,5 ppb e 1ppb del BDE-47 (vedi figura 2.2.3).

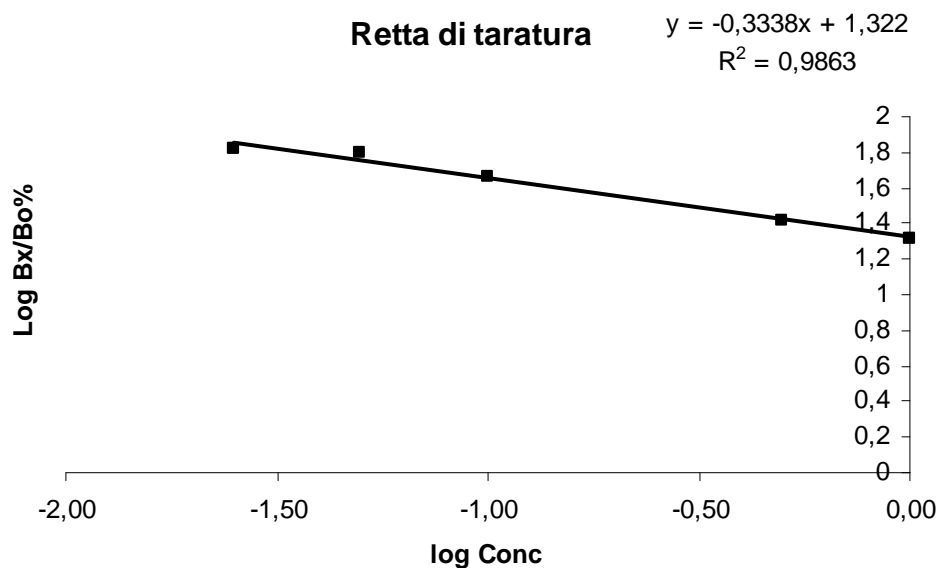


Figura 2.2.3 - Retta di taratura per la quantificazione dei PBDE mediante test ELISA

2.2.4 - Risultati

L'analisi immunoenzimatica mediante test ELISA ha il vantaggio di essere molto più veloce e di semplice realizzazione rispetto alla determinazione gascromatografica; questa presenta però due svantaggi: il primo è che consente di determinare la concentrazione totale dei PBDE presenti senza la possibilità di fare una speciazione dei singoli congeneri, il secondo è di non essere sensibile in ugual modo verso tutti i congeneri. Infatti, è stato sperimentalmente dimostrato che il test è molto sensibile per alcuni congeneri (come ad esempio BDE-47, 99, 28, 100, 153) e poco verso altri (BDE-154, 183, 209) come riportato in tabella 2.2.1.

Come descritto precedentemente, il test da noi effettuato è di tipo competitivo, le assorbanze che noi otteniamo sono inversamente proporzionali alle concentrazioni, di ognuno abbiamo calcolato il segnale percentuale del rapporto tra assorbanza del campione e assorbanza del bianco $\%B_x/B_0$, che variano tra $18,72 \pm 1,03$ e $66,35 \pm 8,08$.

COMPOSTI	LOD (ppb)	50% B/B ₀ (ppb)
BDE-47	0.017	0.135
BDE-99	0.02	0.15
BDE-28	0.045	0.9
BDE-100	0.055	5.5
BDE-153	0.075	10
BDE-154	3.5	580
BDE-183	13.5	2000
BDE-209	370	3000

Tabella 2.2.1 - LOD e 50%B/B₀ per i congeneri a cui è più sensibile il test ELISA

Data la differente risposta del test ELISA nei confronti dei vari congeneri per poter confrontare i risultati del test ottenuti con quelli gascromatografici è stato necessario comparare la % B_x/B₀ con la somma dei valori di concentrazioni ottenuti con l'analisi GC-MS.

I valori di PBDE ottenuti con la tecnica GC-MS sono stati, dunque, corretti moltiplicandoli per dei fattori di correzione che tengono conto della sensibilità del test verso gli specifici congeneri. Il valore, espresso in termini di BDE-47 equivalenti, è stato calcolato utilizzando la seguente formula proposta da Shelver et al. (2008):

$$\mathbf{BDE-47\ eq. = BDE-47 \times 1.0 + BDE-99 \times 0.9 + BDE-28 \times 0.15 + BDE-100 \times 0.025 + BDE-153 \times 0.014}$$

Nella figura 2.2.4 si può vedere il confronto tra i dati ottenuti mediante il test ELISA e i dati ottenuti al GC-MS. Si nota in maniera chiara un andamento analogo per le concentrazioni dei composti determinate mediante tecniche molto diverse tra loro.

Dall'analisi dei risultati si evidenzia, comunque, che l'analisi mediante test ELISA sottostima di poco il reale valore delle concentrazioni; ciò potrebbe essere dovuto al fatto che i fanghi di impianti di depurazione sono una matrice estremamente complessa e con una alta possibilità di interferenza per la grande varietà dei composti presenti.

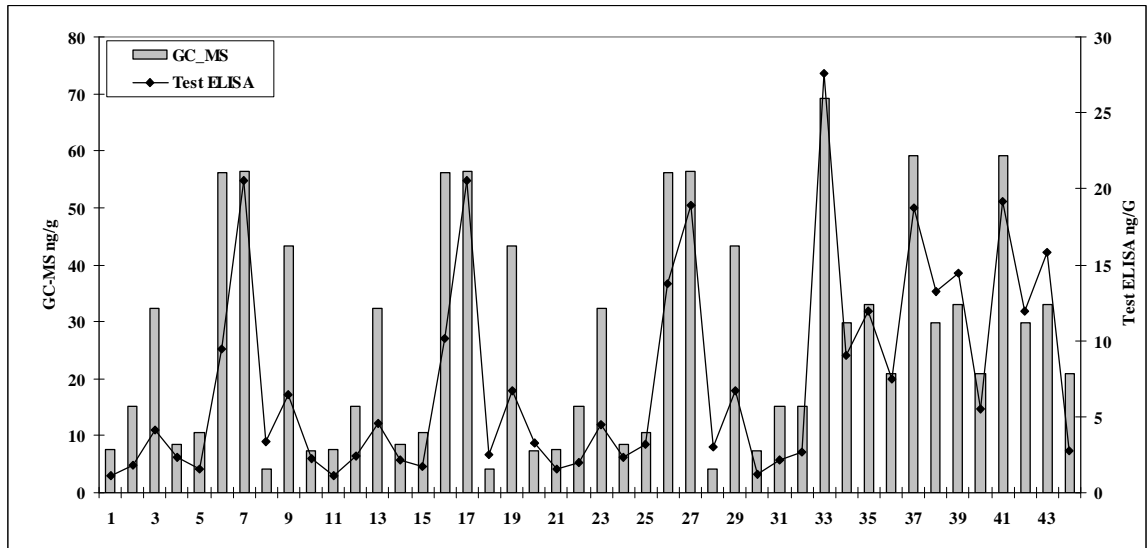


Figura 2.2.4 - Andamento delle concentrazioni di PBDE determinate con il test ELISA e GC-MS

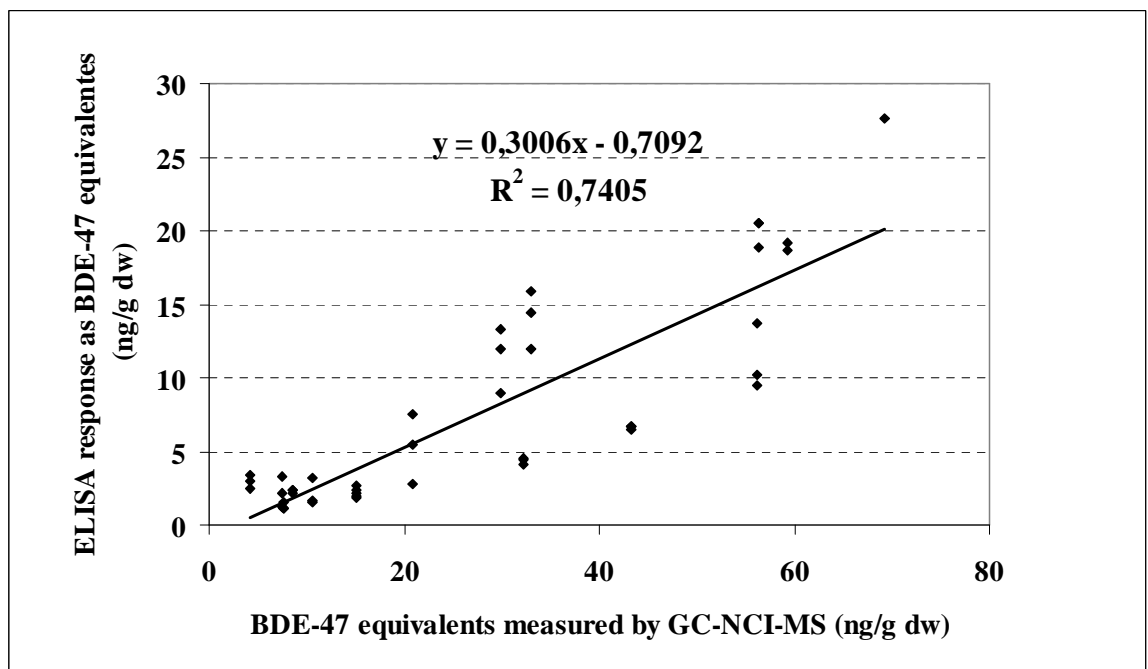


Figura 2.2.5 - Confronto tra le concentrazioni di PBDE determinate con il test ELISA e GC-MS

La correlazione tra i set di dati provenienti dalle due analisi mostra un buon accordo ($r^2=0,7405$). Al fine di valutare la significatività del risultato ottenuto è stato calcolato, per i due set di dati, il coefficiente di Pearson (r), il quale è risultato pari a 0.794, superiore a 0.632 (valore

tabulato relativo per un set di 10 dati, per il test a una coda) con coefficiente di significatività $p=0.05$. Questo risultato ha dimostrato che vi è tra i dati una relazione lineare significativa e che sussiste una probabilità inferiore al 5% che questa correlazione sia casuale e, quindi, spuria.

I risultati ottenuti, quindi, mostrano che vi è correlazione tra i due metodi, con un livello di confidenza (o fiducia) del 95%, vedi figura 2.2.5.

Nonostante alcuni limiti, questa ricerca risulta estremamente interessante ed innovativa, in quanto per la prima volta il test ELISA viene applicato alla matrice fango ed i risultati ottenuti vengono comparati con analisi GC-MS; in letteratura, infatti, esistono solo studi che hanno utilizzato un tale tipo di approccio applicandolo a campioni di suolo e acqua (quest'ultima matrice è, comunque, quella che, in generale, ha mostrato una maggiore affinità per questo tipo di analisi, poiché è una matrice semplice).

Dal confronto tra i due metodi analitici si può concludere che il test ELISA possa essere un saggio di screening molto conveniente in termini di tempi e costi, si caratterizza come un metodo di analisi preliminare, che consente una prima valutazione del grado di inquinamento da PBDE della matrice.

Il presente studio, ci ha comunque consentito non solo di indagare il livello di contaminazione della matrice fango proveniente da impianti di depurazione liquami ma, anche, di capire come la scelta fra le due tipologie di tecniche analitiche debba essere fatta in funzione del tipo di specificità richiesta.

2.3 - Contaminazione delle zone limitrofe ad un impianto di depurazione liquami

Parte di questo progetto di ricerca prevedeva la valutazione degli impianti di depurazione liquami come fonti significative di PBDE in atmosfera.

I PBDE, come tutte le sostanze organiche semi-volatili, sono soggette ai processi di scambio aria-acqua e al trasporto atmosferico a lunga distanza (LRAT). L'atmosfera è dunque un importante mezzo di dispersione di questi inquinanti nell'ambiente, così come un mezzo di esposizione, trasferimento e trasporto di PBDE. La presenza di questi inquinanti in atmosfera è stata rilevata in varie località considerate di back-ground come la zona dei grandi laghi degli Stati Uniti (*Strandberg et al., 2001; Venier e Hites, 2008*) e l'Artico (*de Wit et al., 2006*), così come in campioni prelevati in aree di recupero di materiale elettronico ed elettrico e in impianti di smaltimento. Tuttavia solo pochi studi hanno determinato il livello di PBDE nell'atmosfera urbana e studiato la loro distribuzione tra fase gassosa e fase particolato. Gli studi svolti in Inghilterra, in Turchia, in Kuwait e in Cina (*Wilford et al., 2008; Cetin e Odabasi, 2008; Gevao et al., 2006; Chen et al., 2006*) hanno dimostrato che i centri urbani sono una significativa sorgente di PBDE in atmosfera.

Durante questo studio, sono stati analizzati campioni atmosferici prelevati all'interno di due impianti di depurazione acque reflue e nelle zone limitrofe a questi al fine di valutare se questa tipologia di impianti avesse un rilevante impatto ambientale. La qualità dell'aria è stata studiata considerando sia la componente gassosa, dove si trovano disciolte tutte le sostanze più volatili, che quella particolato, materiale disperso in aria in cui si trovano spesso adsorbite sostanze volatili o semi-volatili.

In questo progetto sono stati determinati, qualitativamente e quantitativamente, i PBDE presenti nell'atmosfera, interna ed esterna, presso due impianti di depurazione acque reflue: l'impianto di depurazione di Baciacavallo (Prato) e l'impianto di depurazione di Calice (Aglia, Pistoia). Per quanto riguarda la descrizione delle caratteristiche dei due impianti presi in esame consultare il capitolo 2.1.2. Per valutare l'impatto che essi hanno sulla qualità dell'aria nelle zone circostanti sono stati prelevati campioni di aria in fase gassosa e in fase particolato, sia PTS che PM10, sono stati valutati i punti interni all'impianto che maggiormente immettono inquinanti e le zone esterne che potenzialmente risentivano maggiormente della contaminazione. Altra prerogativa di questo progetto è stata la ricostruzione di un trend temporale di concentrazioni di PBDE alla luce dell'entrata in vigore nel 2004 delle nuove normative in materia ambientale.

2.3.1 - Campionamento e trattamento dei campioni

I campioni di particolato atmosferico e fase gassosa sono stati raccolti presso gli impianti di depurazione acque reflue di Baciacavallo (PO) e Calice (Agliaia, PT) in un arco temporale compreso tra Maggio 2000 e Maggio 2006, durante diverse campagne di campionamento.

Il campionamento del particolato totale e della fase gassosa è stato realizzato con un campionatore TE-1000BL PUF (*Poly-Urethane Foam*) ad alto volume (Tisch Environmental, Inc USA) che consente di valutare, oltre al particolato totale (*Total Suspended Particle*, TSP), le sostanze presenti in fase gassosa mediante il loro adsorbimento su spugna di poliuretano (PUF), vedi Figura 2.3.1.



Figura 2.3.1 - Campionatore TE-1000BL PUF

Il TSP è stato raccolto su filtri in fibra di quarzo TO-13 (SKC) precedentemente trattati in muffola a 450°C per 12 ore. La fase gassosa è stata raccolta su cartucce in spugna poliuretana (PUF), pretrattate prima dell'uso con due cicli di lavaggi successivi in soxhlet, uno in acetone e l'altro in etere di petrolio di 24 ore ciascuno. Sia i filtri che i PUF sono stati conservati a -20° C fino al momento delle analisi.

Per il campionamento del PM10 è stato usato un campionatore ad alto volume Graseby Andersen PM10 Mod. SAUV-1H, che consente la raccolta di particelle con taglio dimensionale inferiore ai 10 µm. Il flusso di aspirazione è stato regolato a 1,13 m³/min, mediante un kit di calibrazione GMV-25. Le particelle di aerosol sono state raccolte su filtri in fibra di quarzo Whatman QM-A, preventivamente trattati in muffola a 450°C per 24 ore. I campioni di particolato raccolti sono relativi ad un tempo di campionamento di circa 24 ore. Una volta raccolti, i campioni sono stati conservati in apposita camera fredda, a circa -25°C, fino al momento del trattamento e dell'analisi.

Nelle Tabelle 2.3.1. e 2.3.2. sono riportati i dati relativi a ciascuno campionamento, rispettivamente di Calice e di Prato.

Campioni Calice PTS/PUF	
Siti interni all'impianto	
INT 1	22-23 Giugno 2004
INT 2	28-29 Giugno 2004
INT 3	6-7 Luglio 2004
Siti esterni all'impianto	
EST 1	13-14 Luglio 2004
EST 2	20-21 Luglio 2004
EST 3	27-28 Luglio 2004
Campioni Calice PM10	
Siti interni all'impianto	
Vasche di ossidazione	15-16 Aprile 2004
Sala controllo impianto	27-28 Aprile 2004
Sala filtropressa	12-13 Maggio 2004
Vasche di aerazione	20-21 Maggio 2004
Siti esterni all'impianto	
Via lungo Calice – 37	20-21 Settembre 2004
Via lungo Calice –14	21-22 Settembre 2004
Via lungo Calice – 65	22-23 Settembre 2004
Via di Calice – 16	19-20 Maggio 2004
Via di Pantanelle	26-27 Maggio 2004
Via di Calice-1	20-21 Aprile 2006
Via lungo Calice - 37	4- 5 Maggio 2006
Via lungo Calice - 65	17-18 Maggio 2006
Via lungo Calice-14	30-31 Maggio 2006
Vasche di ossidazione	24-25 Luglio 2006
Zona nuova impianto	26-27 Luglio 2006
Via di Pantanelle	27-28 Luglio 2006

Tabella 2.3.1 - Dati relativi ai campioni PTS/PUF e PM10 raccolti a Calice

Campioni Prato PM10		
Nome Campione	periodo campionamento	Indirizzo
PRATO 0	18 maggio 2000	Via Baciacavallo, 36
PRATO 1	15 giugno 2000	Via Parini, 4
PRATO 2	19 giugno 2000	Via Soffici, 28
PRATO 3	23 giugno 2000	Via Soffici, 30
PRATO 4	26 giugno 2000	Via dell' Alloro, 89/A
PRATO 5	28 giugno 2000	Via Soffici,72
PRATO 6	29 giugno 2000	Via Lunga di Cafaggio,53
PRATO 7	24 agosto 2000	Via Gacci, 27
PRATO 8	25 ottobre 2000	Via dell' Alloro, 2/7
PRATO 10	16 gennaio 2001	Via Soffici, 10
PRATO 11	17 gennaio 2001	Calvana-Via Papa Giovanni- <i>Circolo tennis Costa azzurra</i>
PRATO 12	18 gennaio 2001	Via Firenze, 253
PRATO 13	3-4 Aprile 2002	Via del Ferro <i>Scuola edile pratese</i>
PRATO 14	15-16 Aprile 2002	Via Brugnaro <i>Scuola elementare Casale</i>
PRATO 15	17-18 Aprile 2002	Via Traversa Pratese <i>Scuola Tobbiana+Aziende tessili</i>
PRATO 16	18-19 Aprile 2002	Via Paronese
PRATO 17	22-23 Maggio 2002	Via Paronese <i>Vigili del fuoco</i>
PRATO 18	3-4 Giugno 2002	Via Paronese, 5
PRATO 19	4-5 Giugno 2002	Via del Ferro, 84 <i>Tintoria Alessandrini</i>
PRATO 20	10-11 Giugno 2002	Via Bessi, 5 <i>Rugby Club</i>
PRATO 21	11-12 Giugno 2002	Via del Molinuzzo, 10 <i>Tintoria Lux</i>
PRATO 22	12-13 Giugno 2002	Via delle Pollative, 4 San Giusto
PRATO 23	13-14 Giugno 2002	Via del Lazzeretto, 57
PRATO 24	22-23 Luglio 2002	Località Cottede - Montepiano
PRATO 25	29-30 Luglio 2002	IDL Calice

Tabella 2.3.2 - Dati relativi ai campioni di PM10 raccolti a Prato.

In figura 2.3.2 è riportata la mappa dei siti di campionamento presso l'impianto di Calice.

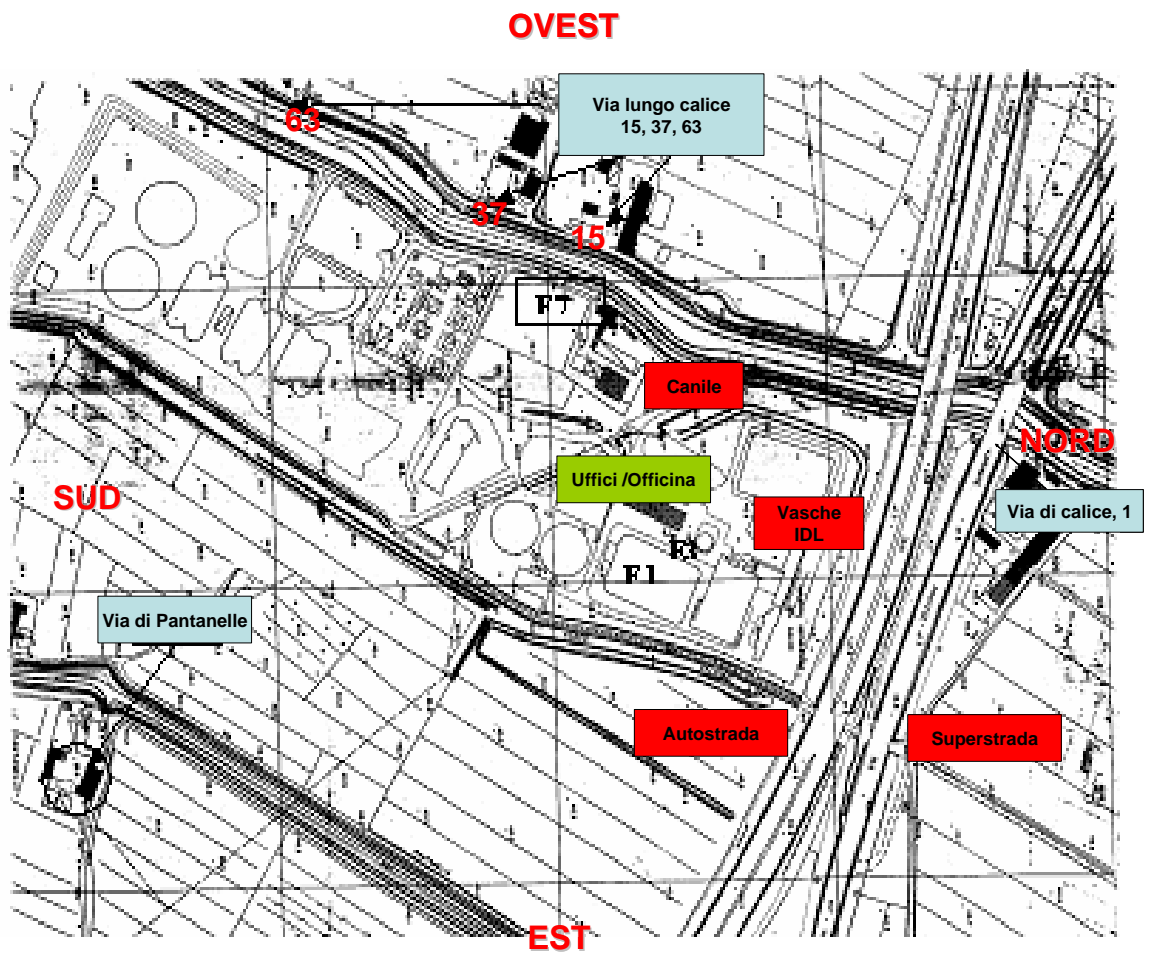


Figura 2.3.2 – Mappa dei siti di campionamento a Calice

In figura 2.3.3 è riportata la mappa dei siti di campionamento presso l'impianto di Baciacavallo a Prato.



Figura 2.3.3 - Mappa dei siti di campionamento a Prato.

Estrazione dei filtri (PM10, PTS)

I filtri, in fibra di quarzo, sono stati pesati (per determinare il peso del PM10 e del PTS campionato) e successivamente estratti in soxhlet per 16 ore con diclorometano (CH_2Cl_2), vedi figura 2.3.4, dopo aggiunta di 1 ml di uno standard interno, nella fattispecie una soluzione di BDE-77 a concentrazione nota.

Gli estratti sono stati concentrati, prima mediante Rotavapor fino ad un volume di circa 5 ml, e poi, in bagno di ghiaccio, sotto leggero flusso di azoto, fino ad un volume di circa 1 ml, prima di procedere alla fase di clean-up.



Figura 2.3.4 - Apparatii di estrazione soxhlet

La procedura di clean-up è di fondamentale importanza perché consente l'eliminazione di tutte quelle sostanze che possono venir co-estratte insieme ai PBDE e possono provocare interferenze nel processo di analisi.

Gli estratti sono stati sottoposti a clean-up utilizzando una colonna in vetro Pyrex lunga 30 cm, con un diametro interno di 75 mm, impaccata con esano pestanal, a partire dal basso, con:

- lana di vetro
- circa 8 g di silice pre-trattata con diclorometano
- solfato di sodio anidro

La silice usata è stata precedentemente trattata in soxhlet per circa 16 ore con diclorometano pestanal, mentre il solfato di sodio è stato precedentemente trattato in muffola a 400 °C per circa 8 h. Sia la silice trattata che il solfato di sodio sono poi stati conservati in apposita stufa a 150 °C fino al momento dell'utilizzo.

Una volta che le colonne sono state impaccate e condizionate con esano pestanal si è proceduto all'immissione del campione, che è stato successivamente eluito con 25 ml di esano pestanal, prima, e con 50 ml di una miscela costituita da esano:diclorometano (4:1 v/v). L'eluito è stato raccolto in un pallone e concentrato fino ad un volume di circa 5 ml con rotavapor. Per eliminare le tracce d'acqua eventualmente presenti nell'estratto purificato si è ricorso alla procedura di anidificazione mediante colonna di solfato di sodio anidro. In seguito al processo di anidificazione il campione è stato portato a piccolo volume (tra 100 μ l e 500 μ l circa) sotto leggero flusso di azoto in bagno di ghiaccio.

Successivamente, 1 μl dell'estratto purificato, anidrificato e concentrato è stato sottoposto ad analisi gas-cromatografica accoppiata a spettrometria di massa per la rivelazione e quantificazione dei PBDE; per le condizioni strumentali vedi il capitolo 2.1.3.

Estrazione dei PUF

I campioni raccolti su spugne di poliuretano (PUF) sono stati estratti in soxhlet mediante due estrazioni successive di 24 ore ciascuna prima con acetone e poi con etere di petrolio.

Allo scopo di quantificare il recupero della procedura ad ogni campione, prima dell'estrazione, è stata aggiunta una quantità nota di BDE-77 come standard interno. Gli estratti in acetone e etere di petrolio sono stati rotavaporati separatamente fino ad un volume di circa 5 ml e quindi riuniti. Sono stati poi aggiunti 10 ml di esano per eliminare completamente, tramite l'evaporazione, l'acetone e l'etere di petrolio, ed ottenere così una soluzione finale in esano.

L'estratto in esano è stato in seguito concentrato fino a circa 5 ml, con rotavapor, e ad 1ml sotto leggero flusso di azoto mantenendo la provetta in bagno di ghiaccio. Il campione è stato purificato con la stessa procedura seguita per i filtri, come descritto sopra.

Un aliquota del campione, 1 μl , è stata iniettata al GC-NCI-MS (vedi capitolo 2.1.3).

Prima di ciascuna estrazione è stata aggiunta una quantità nota di standard interno BDE-77 per valutare il recovery della metodica di estrazione. La media del recovery per l'estrazione dei PUF è stata di $85\pm 12\%$ mentre per i filtri (PTS e PM10) è stata di $86\pm 26\%$. Le concentrazioni dei PBDE determinati nei campioni non sono stati corretti per il recovery. Prove di estrazione ($n = 5$) fatte aggiungendo alla procedura di estrazione una quantità nota di una miscela contenente tutti i congeneri avevano dimostrato una efficienza media di estrazione di tutti i congeneri che andava dal $78\pm 12\%$ per il BDE-28 a $103\pm 13\%$ per il BDE-99.

Il detection limit dei filtri (PTS) era $0,007- 0,012 \text{ pg m}^{-3}$ per la maggior parte dei congeneri, e $1,6 \text{ pg m}^{-3}$ per il BDE-209. Il detection limit per i filtri (PM10) era $0,011- 0,023 \text{ pg m}^{-3}$ per la maggior parte dei congeneri, e $0,9 \text{ pg m}^{-3}$ per il BDE-209. Il detection limit per i PUF era compreso tra $0,007-0,094 \text{ pg m}^{-3}$ per la maggior parte dei congeneri, e $0,17 \text{ pg m}^{-3}$ e $0,34 \text{ pg m}^{-3}$ per BDE-47 e BDE-99.

2.3.2. - Risultati

Dopo aver studiato l'accumulo dei PBDE negli impianti di depurazione liquami, vedi capitolo 2.1, e consultato i dati presenti in letteratura, possiamo affermare che i PBDE sono presenti nelle acque di scarico civili ed industriali che raggiungono gli impianti di trattamento acque reflue, nei fanghi prodotti dai processi di depurazione e nelle acque in uscita. Le proprietà chimico-fisiche di questi inquinanti, in particolare la bassa solubilità, gli alti coefficienti di ripartizione ottanolo-acqua (Log K_{ow} varia tra 5,9 e 10), i valori della costante di Henry (compresi tra $7,5 \times 10^{-8}$ e $1,2 \times 10^{-5}$ atm m³/mol) suggeriscono che i PBDE tenderanno a concentrarsi preferenzialmente nei fanghi e a legarsi al materiale particolato aerosolizzato. Infatti, tenendo presente che le acque reflue veicolano non solo svariati microrganismi patogeni ma anche sostanze organiche, la formazione di aerosol durante le varie fasi del loro trattamento può essere la causa del trasferimento e della dispersione di PBDE nell'ambiente circostante.

La formazione di aerosol avviene soprattutto per azione meccanica di organi in movimento, nell'ambito di vortici e salti di livello dei reflui, nelle fasi di pompaggio e in tutti i casi in cui si ha formazione di spruzzi e movimentazione dei liquami. La contaminazione dell'aria da parte di questo tipo di aerosol può subire fenomeni di dispersione in funzione delle caratteristiche strutturali dell'impianto, dei movimenti generati nei diversi processi o dei fattori meteorologici, quali, ad esempio, la velocità e direzione del vento, l'umidità e la temperatura. L'aerosol può, infatti, raggiungere aree più o meno distanti dall'impianto concorrendo alla formazione di un rischio anche per la salute dei residenti la zona circostante l'impianto di depurazione.

A causa dello scarico delle acque reflue trattate negli effluenti locali, e del riutilizzo industriale e/o agricolo delle acque trattate, gli impianti di depurazione acque reflue possono essere considerati anch'essi una sorgente di PBDE nell'ambiente acquoso e atmosferico.

2.3.3 - PBDE nell'atmosfera interna e esterna all'impianto di depurazione acque reflue di Baciacavallo (Prato)

L'impianto di Baciacavallo è il più grande impianto di depurazione acque reflue nell'area di Prato. Le acque reflue che vi vengono trattate sono per l'80% di origine industriale, prevalentemente di carattere tessile, e per il 20% di origine civile.

Per tale motivo le acque in ingresso all'impianto di Baciacavallo sono caratterizzate da alte concentrazioni di tensioattivi, olii, coloranti tessili, solventi organici utilizzati nella produzione e composti organici atti a dare caratteristiche specifiche ai tessuti. Tra queste ultime sostanze rientrano i PBDE, che vengono utilizzati nell'industria tessile per prevenire e rallentare la

combustione accidentale dei tessuti stessi. Le acque reflue trattate dall'impianto di Baciacavallo vengono per lo più re-introdotte nel sistema di acque superficiali (fiume Bisenzio) e, solo parzialmente (100 L/s) vengono ulteriormente raffinate e riutilizzate nel macrolotto industriale per i processi produttivi e per riempire le cisterne della caserma dei vigili del fuoco.

Nei campioni di aerosol vengono ritrovate sostanzialmente le stesse sostanze organiche presenti nelle acque reflue e nei fanghi, con l'eccezione di quelle sostanze altamente volatili che passano direttamente dall'acqua all'aria, in fase gassosa.

Le ricerche condotte da Masi et al. (1999) e Lepri et al. (2000) hanno dimostrato che i nonilfenoli (NP) e i nonilfenolipolietossilati (NPnEO; n=1-3) possono essere usati come traccianti delle emissioni dell'impianto di depurazione liquami. In uno studio recente, Cincinelli et al. (2003) hanno analizzato metà filtro dei campioni di PM10 riportati in questo lavoro di tesi per determinare le concentrazioni di n-alcani, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e NP e NPnEO, allo scopo di valutare il contributo di ciascuna sorgente (l'impianto di depurazione liquami, l'aerosol biogenico, l'attività industriale, le strade urbane e le autostrade) presente nell'area investigata. Le maggiori concentrazioni di NP e NPnEO sono state trovate nei campioni prelevati all'interno dell'impianto; le concentrazioni più alte nei campioni esterni sono state riscontrate quando il vento soffiava dalla direzione dell'impianto. Non è stata trovata una stretta correlazione tra la concentrazione di NP e NPnEO e quella dei PBDE, pertanto l'impianto di Baciacavallo non può essere considerato sorgente esclusiva di PBDE nell'atmosfera circostante l'impianto, soprattutto alla luce del fatto che alcuni campioni presentano concentrazioni dei congeneri della miscela Penta-BDE, BDE-183 e BDE-209 molto elevate, talvolta superiori a quelle di Prato 0, sito interno all'impianto, come si può osservare nella tabella 2.3.3, dove sono riportate le concentrazioni (pg m^{-3}) di PBDE determinate per tutti i campioni di PM10.

I siti di campionamento sono dislocati su una vasta superficie comprendente quasi tutta la città di Prato, dobbiamo quindi premettere che le distanze dall'impianto, e quindi la sua influenza, sono molto diverse da un sito all'altro, inoltre, i siti sono locati in zone della città molto diverse tra di loro, alcune residenziali altre più industrializzate.

	BDE-47 pg m ⁻³	BDE-99 pg m ⁻³	BDE-100 pg m ⁻³	BDE-153 pg m ⁻³	BDE-154 pg m ⁻³	Penta-BDE pg m ⁻³	BDE-183 pg m ⁻³	BDE-209 pg m ⁻³
PRATO 0	11,15	39,24	14,31	35,36	27,66	127,72	89,17	10398
PRATO 1	36,05	63,44	17,01	9,71	7,81	134,02	44,30	92,68
PRATO 2	16,77	31,64	7,90	3,24	3,27	62,82	4,64	19,22
PRATO 3	20,50	28,41	7,33	5,18	4,31	65,72	8,30	40,24
PRATO 4	17,82	30,28	7,96	5,21	5,72	66,99	7,34	388,08
PRATO 6	12,22	21,70	5,24	3,27	2,57	45,00	4,81	24,29
PRATO 7	7,83	17,59	3,74	2,67	1,78	33,62	4,87	5,91
PRATO 8	141,10	134,29	0,08	7,88	8,68	292,02	13,16	12,85
PRATO 10	14,29	11,28	5,70	3,32	3,25	37,84	14,28	11,59
PRATO 11	19,84	13,64	4,17	2,08	1,92	41,66	3,41	91,98
PRATO 13	32,66	58,49	12,99	2,30	2,78	109,22	1,04	6,73
PRATO 14	3,12	1,92	0,70	0,62	0,43	6,79	1,03	7,22
PRATO 15	44,36	33,24	13,32	3,60	5,28	99,80	25,54	10364
PRATO 16	10,44	10,31	3,90	2,88	3,00	30,52	19,42	5,57
PRATO 17	34,30	28,94	10,37	3,56	3,46	80,63	9,44	2700
PRATO 18	82,86	27,33	17,30	0,48	0,33	128,29	1,06	8,45
PRATO 19	18,42	23,82	7,23	4,26	2,78	56,52	9,23	13,93
PRATO 20	9,17	9,12	2,68	2,39	1,55	24,90	5,96	40,37
PRATO 21	17,46	25,45	9,34	9,09	5,32	66,66	23,69	4705
PRATO 22	356,70	134,22	43,58	6,18	8,29	548,96	6,21	42,59
PRATO 23	35,53	32,01	10,65	4,19	3,39	85,77	7,22	29,67
PRATO 24	4,86	6,90	2,90	3,87	6,25	24,78	13,71	82,15

Tabella 2.3.3 - Concentrazioni dei principali congeneri di PBDE trovate nei campioni di PM10 interni ed esterni dell'impianto di depurazione di Baciacavallo

Nei campioni prelevati all'esterno dell'impianto la concentrazione della miscela Penta-BDE varia tra $24,78 \pm 1,42$ e $548,96 \pm 7,45$ pg m⁻³, il BDE-183 tra $1,03 \pm 0,03$ a $44,30 \pm 3,29$ pg m⁻³ e il deca-BDE tra $5,57 \pm 0,87$ a 10364 ± 227 pg m⁻³.

In figura 2.3.5 sono riportate le concentrazioni delle tre miscele commerciali principali di PBDE per ciascun campione. Come si può osservare dalla figura, i congeneri della miscela Penta-BDE sono presenti in misura preponderante in tutti i campioni, fatta eccezione per i campioni Prato 0, 4, 11, 15, 17, 21 e 24, in cui sono state trovate concentrazioni di BDE-209 molto più elevate rispetto a tutti gli altri congeneri. Le alte concentrazioni della miscela Penta-BDE possono essere spiegate dal fatto che i campioni sono stati prelevati nel 2002, quando ancora non erano entrate in vigore le restrizioni di produzione, utilizzo e commercializzazione delle miscele Penta-BDE e Octa-BDE.

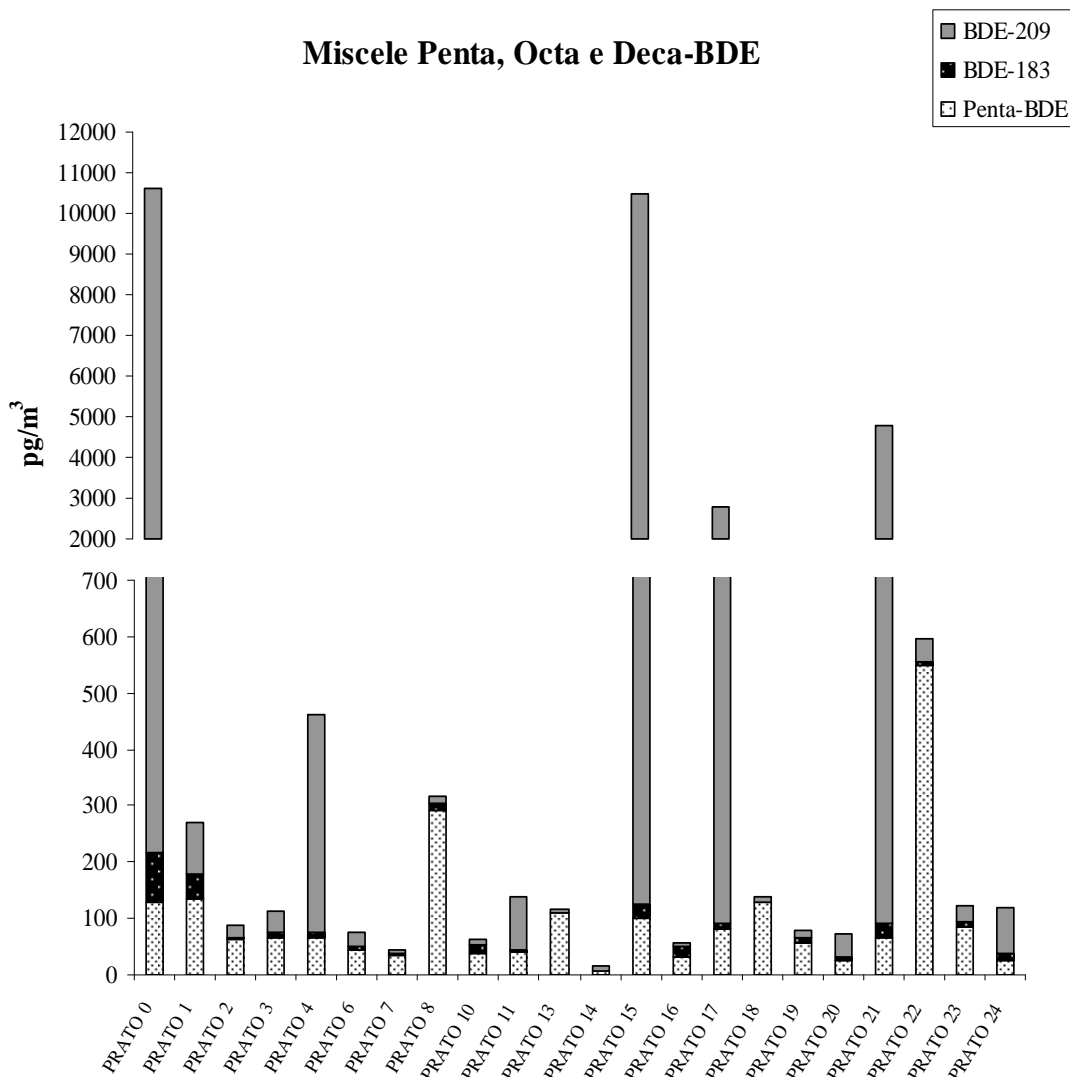


Figura 2.3.5. - Concentrazione della miscela Penta-BDE, Octa-BDE e Deca-BDE per i campioni prelevati a Prato.

Appare curioso il risultato relativo al campione Prato 15 (10364 pg m^{-3}), campionato nel giardino della scuola di Tobbiana, in quanto non era attesa una concentrazione di BDE-209 così elevata. Indagando sulle varie aziende presenti nell'area, abbiamo scoperto la presenza di piccole aziende tessili che potrebbero giustificare il valore di concentrazione di BDE-209. Le concentrazioni riscontrate nel campione Prato 21 (4705 pg m^{-3}), prelevato in un punto prospiciente una tintoria, avvalorano questa ipotesi.

Non appare insolito, invece, il valore di concentrazione del campione Prato 17 (2700 pg m^{-3}), raccolto all'interno della caserma dei vigili del fuoco, poiché nelle tute e nei materiali utilizzati dai vigili del fuoco i PBDE vengono aggiunti come ritardanti di fiamma.

Il livello di concentrazione di BDE-209 trovato presso Prato 4 (388 pg m^{-3}) è giustificato dal fatto che è stato prelevato in un punto molto vicino all'impianto di depurazione di Baciacavallo, sottovento rispetto all'impianto stesso.

Inaspettati appaiano anche i valori di concentrazione misurati per Prato 11 (92 pg m^{-3}) e Prato 24 (82 pg m^{-3}) in quanto sono stati prelevati in due siti della Calvana e di Montepiano, lontani dalla città e dalle principali sorgenti emmissive di PBDE. Tuttavia i due siti di campionamento sono accomunati dalla presenza di un circolo tennistico nell'area, con campi da tennis in terra rossa. Dall'analisi effettuata sulla terra rossa di entrambi i siti, è risultato evidente che essa può essere una fonte di PBDE in atmosfera: infatti la concentrazione media della miscela Penta-BDE è $1,72 \pm 0,08 \text{ pg g}^{-1}$, di BDE-183 è $1,54 \pm 0,21 \text{ pg g}^{-1}$ e di BDE-209 è $3,56 \pm 0,65 \text{ ng g}^{-1}$.

I dati confermano che nei siti dove sono presenti sorgenti aggiuntive di PBDE, oltre all'impianto di depurazione acque reflue, come ad esempio le tintorie, la caserma dei vigili del fuoco e gli impianti da tennis, la concentrazione di BDE-209 mostra valori più elevati rispetto a tutti i PBDE presi in esame. Campionando su'area così vasta e differenziata è facile trovare ulteriori sorgenti che influenzano i dati dei nostri campioni, elevati valori del BDE-209 rispecchiano la tendenza degli ultimi 10 anni di sostituire la miscela Penta-BDE e Octa-BDE con la miscela Deca-BDE.

2.3.4 - PBDE nell'atmosfera interna ed esterna l'Impianto di depurazione acque reflue di Calice (Aglia, PT)

PUF/PTS

Le acque reflue, prevalentemente civili, trattate dall'impianto di Calice (Aglia, Pistoia) vengono per lo più riutilizzate per garantire una risorsa idrica aggiuntiva al sistema produttivo pratese, e per l'irrigazione nell'attività vivaistica della provincia di Pistoia.

Il campionamento di campioni in fase gassosa e fase particolato è stato effettuato in due zone diverse: i campioni siglati come INT1, INT2, INT3 sono stati prelevati in un sito di campionamento interno all'impianto, mentre i campioni EST1, EST2 ed EST3 in un sito esterno all'impianto (via Pantanelle). E' di fondamentale importanza misurare entrambe le fasi (fase gassosa e fase particolato) per avere una misura accurata delle concentrazioni di questi inquinanti in atmosfera; la conoscenza di questa ripartizione è importante in quanto regola i processi di deposizione, degradazione, trasporto e destino di questi inquinanti.

Nella tabella 2.3.4 sono riportate le concentrazioni medie dei PBDE investigati nei sei campioni prelevati in fase gassosa e in fase particolato (tre siti interni e tre siti esterni).

I dati nella tabella 2.3.4 mostrano che mentre il BDE-209 è stato trovato solo in fase particolato, con una media di $31,16 \pm 5,22 \text{ pg m}^{-3}$, tutti gli altri congeneri sono stati trovati in entrambe le fasi. La concentrazione totale (fase gassosa + fase particolato) intesa come la somma di BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154 (costituenti la miscela Penta-BDE) e BDE-183 (miscela Octa-BDE) ha una media di $40,09 \pm 13,45 \text{ pg m}^{-3}$ nella fase particolato e di $104,86 \pm 39,38 \text{ pg m}^{-3}$ nella fase gassosa (numero di campioni = 6).

	Fase gassosa (pg m^{-3})							
	22-giu-04	28-giu-04	6-lug-04	13-lug-04	20-lug-04	27-lug-04	Media	Dev.standard
BDE-47	85,40	48,67	68,82	48,77	65,45	23,34	56,74	21,39
BDE-99	66,57	6,8	21,9	34,54	48,54	16,33	32,45	22,17
BDE-100	6,78	5,76	10,03	22,66	8,86	12,45	11,09	6,14
BDE-153	0,98	2,34	0,96	0,89	5,23	2,41	2,14	1,67
BDE-154	1,02	0,98	0,88	1,96	1,45	1,78	1,35	0,45
Penta-BDE	160,75	64,55	102,59	108,82	129,53	56,31	103,76	39,31
BDE-183	1,23	1,33	0,56	0,76	1,67	1,08	1,11	0,40
Penta-BDE + BDE-183	161,98	65,88	103,15	109,58	131,20	57,39	104,86	39,38
BDE-209	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Fase particolato (pg m^{-3})							
	22-giu-04	28-giu-04	6-lug-04	13-lug-04	20-lug-04	27-lug-04	Media	Dev.standard
BDE-47	5,34	6,40	13,22	12,76	9,87	5,43	8,84	3,62
BDE-99	11,67	3,13	14,20	21,33	17,44	10,70	13,08	6,24
BDE-100	4,09	1,25	3,10	11,45	2,17	5,66	4,62	3,68
BDE-153	1,65	6,72	1,56	2,88	14,21	5,22	5,37	4,79
BDE-154	1,38	1,86	1,29	2,65	3,77	2,19	2,19	0,93
Penta-BDE	24,13	19,36	33,37	51,07	47,46	29,20	34,10	12,71
BDE-183	7,78	3,21	4,64	5,01	8,55	6,78	6,00	2,04
Penta-BDE + BDE-183	31,91	22,57	38,01	56,08	56,01	35,98	40,09	13,45
BDE-209	28,61	27,87	35,64	38,56	31,77	24,53	31,16	5,22

Tabella 2.3.4 - Concentrazioni medie (pg m^{-3}) dei PBDE nei campioni di Calice PUF/PTS.

Esistono pochi dati in letteratura per poter confrontare i dati ottenuti in questo studio, vedi tabella 2.3.5. I livelli di concentrazione totali sono molto più alti rispetto a quelli determinati in campioni atmosferici presi vicino ad impianti di riciclaggio metalli in Giappone (*Harner e Shoeib, 2002*) che avevano mostrato livelli di tri-BDE e esa-BDE che variavano tra 7,1 e 53 pg m^{-3} . In campioni di aria prelevati in Svezia la somma di BDE-47, -99 e -100 variava tra 1 e 8 pg m^{-3} , contro i $72-179 \text{ pg m}^{-3}$ ottenuti in questo studio. In uno studio condotto nell'arco di tre anni intorno alla zona dei grandi laghi americani, considerata zona rurale e remota, sono state rilevate concentrazioni di PBDE tra 4,4 e 21 pg m^{-3} . Tuttavia i livelli trovati nell'atmosfera di Calice sono simili alle concentrazioni totali medie misurate in una delle due aree industriali della città di Guangzhou, tipico centro urbano nella Cina del Sud ($229,6 \text{ pg m}^{-3}$), caratterizzata da industrie produttrici di materiale elettrico ed elettronico, materiali plastici, tessili e accessori per automobili. I campioni prelevati nell'altra area industriale mostravano invece un livello medio di concentrazione molto più alto ($3672,7 \text{ pg m}^{-3}$) (*Chen et al., 2006*).

Gli alti livelli di concentrazione trovati in questo studio possono essere anche legati all'influenza della temperatura atmosferica durante la fase di campionamento, in quanto le alte temperature dei mesi estivi favoriscono la volatilizzazione dei composti organici persistenti (POP) da superfici contaminate.

Luogo	Tipologia sito	Periodo di campionamento	□PBDEs (pg m ⁻³)	BDE-209 (pg m ⁻³)	Riferimento bibliografico
Grandi Laghi (USA)	rurale e remoto		4,4-21		Hites, 2004
Svezia	rurale e remoto		1,0-8,01		Harad et al., 2004
Chicago (USA)	urbano	1997-1999	33-77	0.20-0.35	Hites, 2004
Chicago (USA)	urbano	2002-2003	10,7-102	1.5-878	Strandberg et al., 2001
Kyoto (Giappone)	urbano	2000-2001	4,5-65	nd-48	Shoeib et al., 2004
Guangzhou (Cina)	urbano	2004	64,0-110,0	99,9-443,7	Chen et al., 2006
Guangzhou (Cina)	urbano background	2004	41,5-256,8	145,1-888,7	Chen et al., 2006
Guangzhou (Cina)	sito industriale	2004	170,4-6594	230,2-11464	Chen et al., 2006
Guangzhou (Cina)	sito industriale	2004	172,7-354,3	169,4-1420	Chen et al., 2006
Giappone	ambienti di lavoro (aria vicino impianto riciclaggio metalli)		7,1-53		Hamer and Shoeib, 2002
Svezia	aria indoor (impianto riciclaggio apparecchi elettronici)		8363-64360	12000-70000	Wong et al., 2001

Tabella 2.3.5 - Dati presenti in letteratura sui PBDE in atmosfera

Wania e Dugani (2003) hanno studiato il LRAT di molti PBDE usando 4 diversi modelli di destino ambientale. I loro risultati hanno indicato che il BDE-209 ha una caratteristica distanza di trasporto inferiore a 1000 km. Tuttavia il modello sembra anche suggerire che la volatilità molto bassa del BDE-209 implica che questa sostanza venga interamente assorbita dal materiale particolato e che il LRAT, come il destino ambientale di questo inquinante, sarà influenzato dal destino e dal comportamento di queste particelle su cui si trova adsorbito.

Dai risultati del campionamento contemporaneo della fase gassosa e della fase particolato si osserva che il deca-BDE è stato determinato solo nei campioni raccolti in fase particolato e la sua concentrazione varia tra 24,53 e 38,56 pg m⁻³ (vedi tabella 2.3.4). Tuttavia va sottolineato che nonostante il BDE-209 si trovi esclusivamente sul filtro e quindi adsorbito sul materiale particolato, è possibile che esso sia presente anche in fase gassosa ma che venga adsorbito sul filtro durante il campionamento a causa della sua bassa pressione di vapore (Gouin et al., 2006). Questi risultati sono coerenti con i valori trovati da altri studi. Per esempio Ter Schure et al. (2004), riportò valori di BDE-209 in campioni di aria, esclusivamente fase particolato, raccolti nel Mar Baltico tra 1.1 e 74.5 pg m⁻³. In Giappone Hayakawa et al. (2004) hanno osservato concentrazioni comprese tra valori sotto il detection limit e 48 pg m⁻³; mentre Agrell et al. (2004) hanno riportato un valore di concentrazione media di 10.4 pg m⁻³ in campioni raccolti vicino ad un impianto di trattamento e incenerimento rifiuti solidi in Svezia.

PM10

Oltre alla determinazione dei PBDE in fase gassosa e fase particolato, sono stati effettuati campionamenti di PM10, il materiale particolato avente dimensione inferiore a 10 µm può, infatti, penetrare nelle vie respiratorie e provocare gravi danni alla salute umana.

Oltre ai siti esterni, circoscritti in una zona vicina all'impianto, all'interno i campioni di PM10 sono stati prelevati in quattro siti:

- 1) presso le vasche di ossidazione biologica, in quanto esse rappresentano una delle principali fonti di aerosol ricco di composti organici;
- 2) presso il locale filtro-presse durante il lavaggio dei filtri;
- 3) all'interno della sala controllo (area indoor);
- 4) presso l'area destinata all'ampliamento dell'impianto.

Nella tabella 2.3.6 sono riportati i valori delle concentrazioni dei congeneri principali della miscela Penta-BDE, del BDE-183 e del BDE-209, determinati nei campioni di PM10 prelevati all'interno e all'esterno dell'impianto di depurazione acque reflue di Calice.

I campioni prelevati all'interno dell'impianto mostrano livelli di concentrazione molto più alti rispetto a quelli di PM10 prelevati all'esterno, molti dei quali presso i giardini delle famiglie residenti nell'area prospiciente l'impianto, vedi tabella 2.3.6.

I dati relativi al campione prelevato presso la sala controllo indicano addirittura livelli di concentrazione della miscela Penta-BDE notevolmente superiori a quelli misurati nel campione prelevato sopra le vasche di ossidazione biologica. Questo dato non risulta anomalo considerando che nella sala controllo si trovano apparecchiature elettroniche come computer, monitor, cavi elettrici, pannelli elettrici etc., riconosciute sorgenti di PBDE, oltre al fatto che si tratta di un ambiente chiuso in cui non si possono avere fenomeni di miscelazione con masse d'aria non contaminate. Inoltre, l'elevato valore di concentrazione per il BDE-209 trovato per il campione prelevato presso il locale filtro pressa, dove i fanghi vengono disidratati, conferma la tendenza di questo composto a legarsi al materiale particolato.

Il campione prelevato in via Calice, 1 mostra valori di concentrazione della Penta-BDE e del deca-BDE mediamente più elevati rispetto agli altri siti esterni: ciò è probabilmente dovuto al fatto che durante la fase di campionamento il vento ha spirato prevalentemente da SE. Analoga spiegazione può essere data per giustificare il valore di concentrazione trovato per il BDE-209 nel campione di via Lungo Calice, 37, in quanto in alcuni momenti del campionamento il vento proveniva da NE (sotto vento all'impianto).

All'interno della miscela Penta-BDE, i congeneri BDE-47 e BDE-99 sono quelli ritrovati in misura più abbondante, ben rispecchiando la proporzione tra i singoli congeneri presenti nella miscela commerciale Bromkal 70-5DE.

	ANNO	BDE-28	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	Penta(BDE)	BDE-183	BDE-209
INTERNI										
Vasche ossidazione	2004	0,91	57,03	30,93	11,73	3,72	3,35	107,67	10,44	52,28
	2006	0,21	12,90	21,43	7,63	6,72	5,61	54,50	15,79	280,01
Filtro pressa	2004	0,10	27,57	26,29	8,89	2,57	2,56	67,97	7,79	246,01
Zona nuovo impianto	2004	0,43	22,62	32,28	8,22	5,15	3,74	72,44	4,65	33,78
Sala controllo	2004	2,34	143,19	105,43	91,88	29,71	34,88	407,42	11,53	113,58
ESTERNI										
Via Lungo Calice 14	2004	0,16	5,01	11,45	3,09	1,47	1,25	22,43	8,94	13,62
	2006	0,07	2,82	4,92	2,26	1,92	1,56	13,56	5,01	30,70
Via Lungo Calice 37	2004	0,32	21,44	24,68	7,43	2,36	2,54	58,78	4,16	32,98
	2006	0,11	3,66	6,11	2,45	2,22	2,94	17,49	7,27	62,10
Via Lungo Calice 65	2004	0,05	4,19	6,74	2,18	1,38	1,40	15,94	2,82	15,26
	2006	0,10	4,98	5,03	1,67	1,89	1,29	14,95	4,19	29,05
Via di Pantanelle	2004	0,14	5,93	13,89	5,07	1,70	1,48	28,22	2,14	10,18
	2006	0,24	2,52	6,10	1,98	1,25	1,02	13,10	2,54	40,48
Via di Calice 16	2004	0,40	14,39	16,95	5,78	1,98	2,12	41,62	4,53	28,20
Via di Calice 1	2006	0,42	15,69	24,46	7,72	2,78	2,88	53,97	5,29	56,43

Tabella 2.3.6 - Concentrazioni di PBDE nei campioni di PM10 prelevati a Calice in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Tutti i campioni di PM10 prelevati a Calice mostrano che la concentrazione di BDE-209, congenere preponderante della miscela Deca-BDE, è sempre più alta rispetto alle altre miscele commerciali di PBDE nei campioni prelevati del 2006 rispetto a quelli del 2004, prelevati nello stesso sito, vedi figura 2.3.6.

La presenza preponderante del deca-BDE potrebbe riflettere l'attuale utilizzo di BDE-209 nelle produzioni industriali e le possibili perdite per diffusione o usura dai prodotti in uso. L'uso delle formule commerciali di PBDE è infatti cambiato nel tempo. Se in un primo momento erano le miscele Penta-BDE ed Octa-BDE ad essere maggiormente utilizzate, nel grafico si può vedere la percentuale relativa di ciascuna miscela commerciale nei campioni del 2004, successivamente è stata la miscela Deca-BDE ad essere utilizzata in modo esclusivo, a seguito delle restrizioni legislative imposte per le miscele a più basso grado di bromurazione. I dati mostrano che le concentrazioni della miscela Penta-BDE, rappresentata dal BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 e BDE-154, sono in alcuni casi diminuiti di circa il 50% dal 2004 al 2006, in seguito all'entrata in vigore della Direttiva 2003/11/EC che ne vieta la produzione e l'utilizzo. E' invece osservabile un incremento elevato della concentrazione del congenere BDE-209 dal 2004 al 2006, in particolare per il campione prelevato presso la vasca di ossidazione biologica.

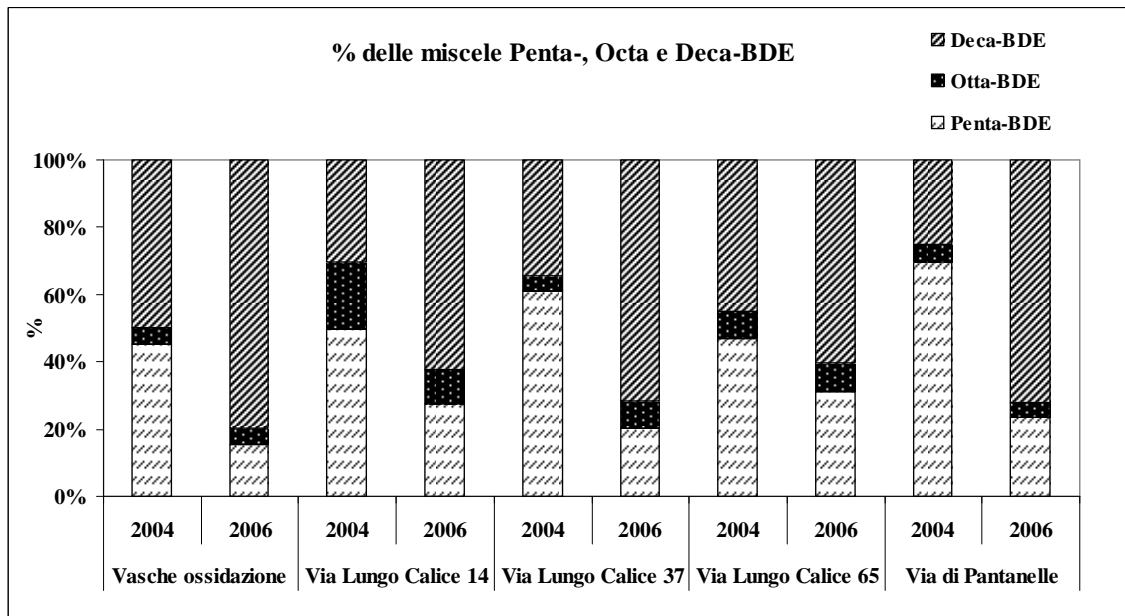


Figura 2.3.6 – Percentuali delle miscele nei campioni del 2004 e del 2006

Dai dati riportati in figura 2.3.7 appare evidente la diminuzione della concentrazione dei congeneri costituenti la miscela Penta-BDE e del BDE-183 dal 2004 (entrata in vigore in Italia della direttiva di restrizione) al 2006; e il contemporaneo aumento del BDE-209.

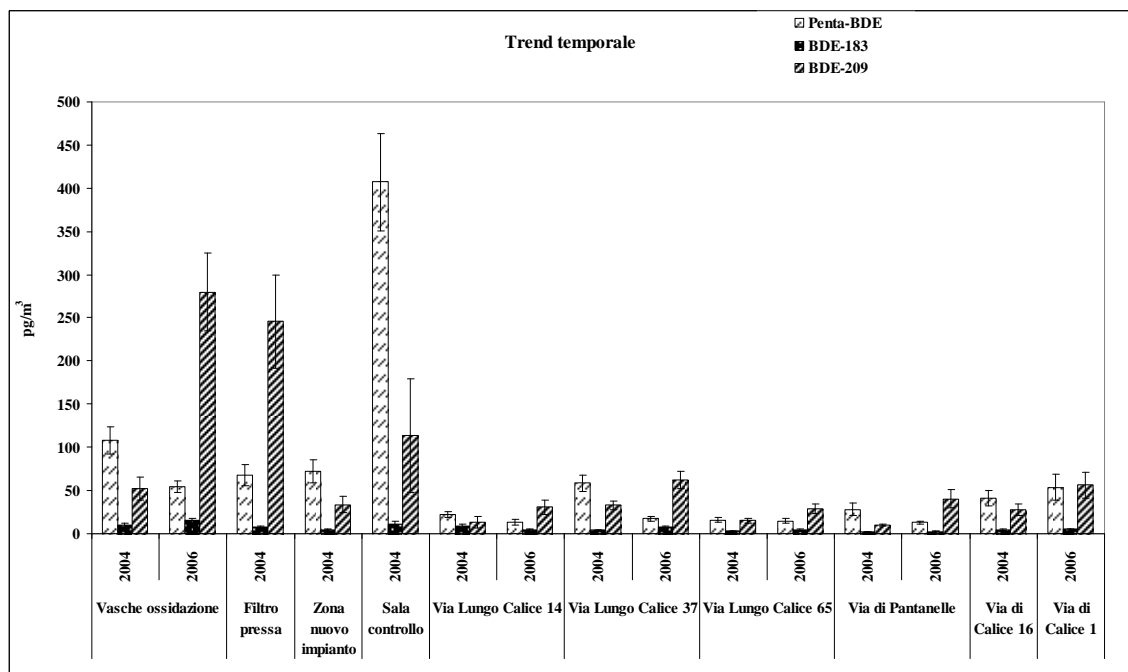


Figura 2.3.7 - Variazioni temporali delle concentrazioni dei vari congeneri di PBDE trovate nei campioni raccolti a Calice.

Guardando, così, i dati ottenuti dall'analisi dei campioni prelevati nei due impianti, possiamo affermare che per il sito di Calice, vista la differenza tra le concentrazioni dei campioni campionati all'interno e quelli all'esterno e che l'unica fonte presente di rilascio di PBDE è l'impianto stesso, si ha una contaminazione delle zone limitrofe all'impianto. Per quanto riguarda l'impianto di Baciacavallo possiamo affermare che i processi depurativi hanno una certa influenza nella contaminazione dell'area esterna all'impianto, anche se, campionando su una zona piuttosto vasta, possibili fonti aggiuntive possono aumentare i livelli delle concentrazioni per alcuni siti.

2.4 - Biomonitoraggio ambientale: *Talitrus saltator* come nuovi biomonitors per PBDE

Il biomonitoraggio ha come fine la valutazione degli effetti prodotti dalle modificazioni ambientali sugli organismi viventi. La crescente urbanizzazione, la realizzazione di nuove aree industriali, inceneritori, dighe, centrali elettriche, discariche, aeroporti e strade comportano la formazione di nuovi equilibri tra gli organismi e l'ambiente in cui essi vivono. Da qui l'idea di utilizzare come indicatori ambientali proprio organismi vegetali o animali che, con la loro presenza-assenza e con il loro affollamento, nella ricerca di un diverso equilibrio con il nuovo ambiente, ci informano sullo stato di salute di un ecosistema. Il biomonitoraggio permette di stimare gli effetti biologici dell'inquinamento dando informazioni più generali sullo stato dell'ambiente, valutando i danni subiti dalla presenza di organismi bersaglio nell'area di studio. Questa, rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, ha il vantaggio di fornire stime sugli effetti combinati di più inquinanti sugli esseri viventi, presenta costi di gestione limitati e dà la possibilità di coprire con relativa facilità vaste zone e territori diversificati, consentendo un'adeguata mappatura del territorio. Le principali tecniche di biomonitoraggio consistono nell'utilizzo di organismi Bioaccumulatori cioè organismi in grado di sopravvivere in presenza di inquinanti che si accumulano nei loro tessuti, e di organismi Bioindicatori, organismi che subiscono variazioni evidenti nella fisiologia, nella morfologia o nella distribuzione spaziale sotto l'influsso delle sostanze presenti nell'ambiente (Yang et al., 2008).

Un obiettivo di questo progetto è stato quello di cercare un organismo che potesse essere un biomonitor per i PBDE, abbiamo così rivolto le nostre attenzioni sugli anfipodi talitridi. Gli anfipodi talitridi, infatti, presentano tutte le caratteristiche principali tipiche di un buon bioindicatore (Vighi e Bacci, 1998; Rainbow, 2006) quali:

- scarsa mobilità nell'ambito dell'area di indagine
- optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio
- presenza diffusa nell'area di studio e facilità di raccolta ed identificazione
- ciclo vitale sufficientemente lungo in modo da riflettere la biodisponibilità di inquinanti presenti in un determinato intervallo di tempo
- sensibilità agli agenti inquinanti, ma non tale da precludere la sopravvivenza
- capacità di tollerare elevate concentrazioni di contaminanti e ampie variazioni dei parametri chimico-fisici, salinità e temperatura, dell'ambiente in cui vivono
- facilità di allevamento e stabulazione per permettere test in laboratorio

In questo studio siamo andati a verificare per la prima volta se gli anfipodi talitridi potessero essere utilizzati come organismi biomonitors del livello di contaminazione da PBDE presenti in

zone costiere dell'area Mediterranea a diverso grado di antropizzazione. Oltre a studiare la bioaccumulazione dei PBDE in questi organismi, è stato effettuato non solo un confronto tra campioni di una stessa specie raccolti in siti e periodi differenti (estate 2009 ed estate 2010), ma anche tra specie diverse di anfipodi come, ad esempio *Talitrus saltator* (*T. saltator*), *Orchestia montagui* (*O. montagui*), *Platorchestia platensis* (*P. platensis*), *Talitrus ugolini* (*T. ugolini*) e *Deshayesorchestia deshayesii* (*D. deshayesii*), per poter verificare l'influenza della specie sulla metabolizzazione e /o accumulo di questi composti.

2.4.1 - L' ambiente costiero

Nonostante le aree costiere siano sempre state sfruttate dall'uomo, i cambiamenti indotti dalle attività umane hanno subito un forte incremento nel corso del XXI secolo (*Nordstrom, 2002; Halpern et al., 2009*): la costruzione di infrastrutture, con conseguente perdita e frammentazione degli habitat, l'erosione costiera, gli interventi gestionali, lo sfruttamento delle risorse naturali ("fisheries", attività estrattive) e le attività a scopo turistico-balneare (*Schlacher et al., 2007; Defeo et al., 2009*).

Le spiagge sabbiose, classificate in base alle caratteristiche della sabbia, del regime tidale e del moto ondoso, sono ambienti estremamente dinamici a causa del movimento incessante dell'acqua, del vento e della sabbia. Le aree costiere rivestono un grande valore dal punto di vista biologico dato che costituiscono delle aree nursery per numerose specie di pesci, siti di nidificazione per molte specie di uccelli e tartarughe marine e ospitano numerosi organismi predati da uccelli ed organismi terrestri (*Schlacher et al., 2007; Defeo et al., 2009*). Questi habitat, pur apparendo sterili e quasi privi di forme di vita, sono caratterizzate da un'elevata biodiversità in quanto ospitano differenti popolazioni di organismi come diatomee, protozoi, batteri e microalghe, i quali formano un'importante rete trofica. Gli invertebrati di maggiori dimensioni, appartenenti al macrobenthos, sono rappresentativi di diversi phyla (molluschi, crostacei, anellidi) e costituiscono la maggior componente in termini di abbondanza e biomassa (*Brown e McLachlan, 1994*).

La forte instabilità, sia giornaliera che stagionale, dei parametri fisici delle spiagge sabbiose quali temperatura, salinità e umidità rendono difficile la sopravvivenza degli organismi che vi risiedono. Per questo motivo, molte delle specie tipiche di questi ambienti presentano peculiari adattamenti morfologici ed eco-fisiologici come la mobilità, abilità nello scavo, esoscheletro protettivo, comportamento ritmico (circadiano, tidale, lunare, stagionale), raffinati meccanismi di orientamento e plasticità comportamentale (*Chelazzie e Vannini, 1988; Brown e McLachlan, 1994*).

Molti studi si sono focalizzati sulla determinazione di sostanze inquinanti a livello di tracce in queste aree; in generale, vengono presi in considerazione tutti i media coinvolti nei processi di trasferimento, diffusione e accumulo ossia: acqua, sedimenti, alghe, organismi.

La difficoltà nel determinare la concentrazione di sostanze inquinanti nel medium acquoso con campionamento puntuale sta nel fatto che, molto spesso, essa fornisce, per alcune classi di composti, valori inferiori al detection limit dello strumento e presenta difficoltà metodologiche in quanto dà indicazioni sul valore della quantità del contaminante presente solo nel momento in cui viene eseguito il campionamento (Rainbow, 2006). Anche l'analisi dei sedimenti presenta delle ostilità; alcune caratteristiche chimico-fisiche, come ad esempio il diametro della particella e il contenuto di carbonio organico, possono condizionare la reale concentrazione degli inquinanti presenti. Ad esempio, sedimenti che contengono elevate quantità di carbonio organico sono in grado di legare quantità maggiori di inquinanti organici. Per tale motivo il confronto tra concentrazioni di composti xenobiotici registrato in sedimenti provenienti da diverse località, ma con caratteristiche differenti, risulta non necessariamente realizzabile senza l'ausilio di ulteriori analisi sui campioni (Rainbow, 2006).

Per valutare, quindi, lo stato della contaminazione ambientale delle zone costiere il biomonitoraggio risultata essere la tecnica con più vantaggi. I biomonitor, sia animali che vegetali, accumulano inquinanti in proporzione alla biodisponibilità di questi nel loro ambiente; la concentrazione degli inquinanti accumulata permette, dunque, di valutare la biodisponibilità totale di tali sostanze. (Rainbow, 2006). La capacità di accumulo delle sostanze inquinanti da parte degli organismi è chiaramente legata alle caratteristiche delle specie considerate. Infatti differenti specie di invertebrati che vivono nello stesso habitat possono presentare differenti valori di concentrazione dello stesso inquinante anche se appartengono a *taxa* strettamente imparentati o allo stesso genere (Moore e Rainbow, 1987; Rainbow, 1998; Ugolini et al., 2005); un chiaro esempio è rappresentato da due specie sintopiche di anfipodi talitridi (*Talitrus saltator* e *Talorchestia ugolini*) che mostrano ampie differenze nell'accumulo di Cd, Hg, Cu e Zn probabilmente a causa di differenze eco fisiologiche (Calosi et al., 2007) e nella zonazione nel sopralitorale (Ugolini et al., 2005).

2.4.2 - Gli anfipodi talitridi

Nel corso degli ultimi anni, molti organismi sono stati proposti come biomonitor per valutare le concentrazioni dei contaminanti della zona intertidale di coste rocciose e del litorale sommerso (Rainbow e Philips, 1993; Zhou et al., 2008). Queste includono alghe, fanerogame marine, anellidi, molluschi e diverse specie di crostacei soprattutto decapodi, balanidi e anfipodi e, negli ultimi anni, agli anfipodi talitridi. Gli anfipodi talitridi sono crostacei di piccole dimensioni che

abitano la zona umida del sopralitorale di coste sabbiose, nutrendosi di materiale di origine sia marina che terrestre. Oltre a rappresentare una delle maggiori componenti in termini di biomassa, essi svolgono un ruolo molto importante per l'ecosistema, essendo detritivori, spazzini e grattatori, si nutrono di materiale di origine sia marina, come materiale organico spiaggiato, che terrestre. Gli anfipodi talitridi, inoltre, costituiscono un importante fonte di cibo per numerose specie di coleotteri, pesci, uccelli ed anche mammiferi (*Palluault, 1954; Griffith et al., 1983; Wildish, 1998; Bergerard, 1989*).

Questa specie ha messo a punto un meccanismo di orientamento zonale che permette loro di rimanere nell'area specifica compatibile con le loro esigenze vitali e di tornare alla zona di elezione della spiaggia ogni volta che se ne allontanano (*Pardi e Ercolini, 1986*). È stato provato e confermato da Williamson (1951) che gli individui di questa specie sono capaci di spostarsi fra i limiti di alta e bassa marea, tenendo tracce all'incirca perpendicolari alla riva. Ad esempio, gli animali tolti di giorno dai loro rifugi sotto la sabbia nella zona intercotidale, zona della costa che delimita il confine tra l'alta e la bassa marea, descrivono tracce rettilinee e parallele verso i limiti dell'alta marea. Gli anfipodi talitridi presentano un ritmo nictemerale assai netto: di giorno rimangono infossati nei loro rifugi scavati nel substrato umido per evitare i rischi di disidratazione e di predazione (*Geppetti e Tongiorgi, 1967; Ruppel, 1967; Wildish, 1983*); al tramonto, o durante il giorno se le condizioni di temperatura e umidità lo permettono, emergono sulla superficie per compiere migrazioni attive, principalmente a scopo alimentare, lungo l'asse mare-terra (asse Y) della spiaggia, perpendicolarmente alla linea di riva (asse X). Gli individui che si allontanano dalla fascia di sabbia umida vi fanno ritorno seguendo la strada ecologicamente più conveniente perpendicolare all'asse X (linea di riva) detta Direzione Teorica di Fuga (DTF) (*Ugolini, 2003*) (*Pardi e Ercolini, 1986*).

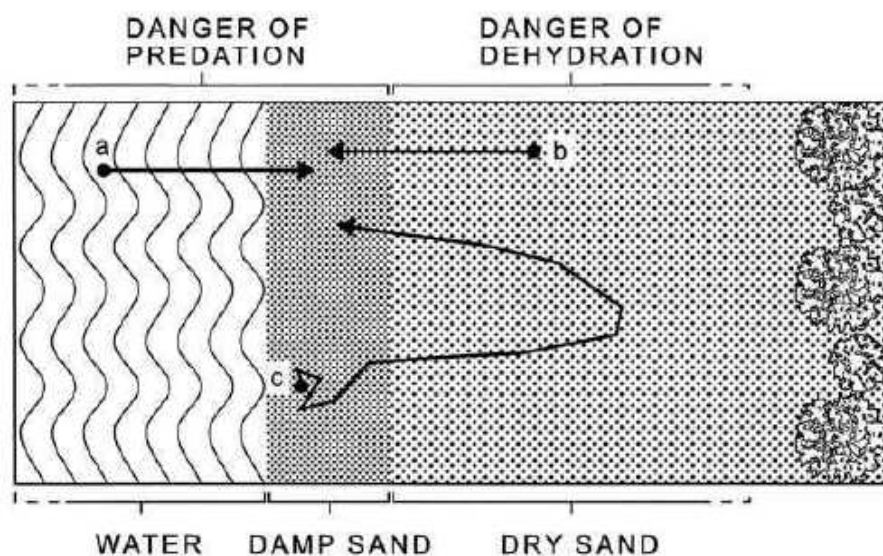


Figura 2.4.1 - Rappresentazione schematica delle traiettorie seguite dai *Talitrus saltator* nel recupero zonale quando si trova: a) sulla sabbia umida; b) durante le escursioni alimentari notturne; c) in acqua.

Questo permette loro di evitare la lunga presenza sia in acqua, dove sono soggetti a predazione da parte di pesci (Ugolini, 1989), sia lontano dalla fascia umida, dove rischiano la disidratazione e la predazione da parte di organismi terrestri (Williamson, 1951; Papi e Pardi, 1953; Pallault, 1954). La scelta della direzione di fuga viene effettuata integrando diversi stimoli esterni sia universali che locali. I fattori orientanti principali sono quelli universali: campo magnetico e gravitazionale terrestre, luce polarizzata, luna e sole (Pardi e Ercolini, 1986). Accanto ad essi è stata rilevata anche l'importanza di fattori locali quali il paesaggio (Williamson, 1953; Ugolini et al., 1986), alcune caratteristiche del substrato come la pendenza e l'umidità della sabbia (Ercolini e Scapini, 1974; Ugolini et al., 1986).

Studi condotti fino ad oggi hanno mostrato la possibilità di utilizzare gli anfipodi sopralitorali come biomonitors della contaminazione da metalli pesanti, ricerche eseguite sulle spiagge sabbiose nord europee (Moore e Rainbow, 1987; Moore et al., 1991, 1995; Rainbow et al., 1998; Fialkowski et al., 2000, 2003, 2009) e lungo le coste del Pacifico meridionale (Rainbow et al., 1993; Marsden et al., 2003) mostrano l'utilizzo di diverse specie (*T. saltator*, *O. gammarellus*, *Orchestia mediterranea*, *Platorchestia platensis*, *Deshayesorchestia deshayesii*, *Talorchestia quoyana*, *Transorchestia chiliensis*) come biomonitors di Cu e Zn (Marsden e Rainbow, 2004). Ulteriori studi condotti nell'area mediterranea hanno dimostrato le elevate doti di bioaccumulo di Cd, Hg, Al e Fe, oltre a Cu, Zn, da parte di una delle comuni specie europee: *T. saltator* (Ugolini et al., 2004, 2005; Fialkowski et al., 2009). La concentrazione di un composto inquinante nei tessuti dei talitri, così come per gli altri organismi utilizzati come biomonitor, è il risultato dei processi di assimilazione, escrezione e detossificazione. Il processo di assimilazione dipende, oltre che dalle caratteristiche dell'organismo, soprattutto dalla biodisponibilità degli inquinanti (Marsden e Rainbow, 2004). Inoltre, le diverse concentrazioni di metalli pesanti accumulati nei tessuti degli anfipodi talitridi, oltre a riflettere la biodisponibilità nell'ambiente, risultano dipendenti dal peso corporeo. Infatti, numerosi studi hanno evidenziato l'esistenza di una relazione tra concentrazione dei metalli nei tessuti (y) delle più comuni specie europee (*T. saltator* e *O. gammarellus*) e peso secco (x) espressa dalla funzione $y = ax^b$, (Amirad, 1987; Rainbow et al., 1989, 1989, 1998; Moore et al., 1991; Fialkowski et al., 2000, 2003). Per i *T. saltator* tale relazione è stata dimostrata per molti metalli tra cui Zn, Cu, Cd, Ni e Fe, anche se, è opportuno sottolineare, che l'effetto delle dimensioni corporee risulta minimo, o quasi assente, per individui adulti con peso secco maggiore di 2 mg (Rainbow et al., 1998).

Le principali fonti da cui i talitri assimilano i metalli sono rappresentate dal cibo e dal medium acquoso (Week e Rainbow, 1991, 1993). Tuttavia, nonostante i talitri vivano in stretto contatto con il substrato e possano probabilmente ingerire insieme al cibo particelle di sabbia, le ricerche riguardanti la possibile importanza del sedimento come fonte di metalli in traccia sono quasi assenti (Marsden e Rainbow, 2004).

L'escrezione avviene principalmente attraverso le ghiandole antennali, le branchie, l'intestino e il processo di muta (Marsden e Rainbow, 2004), mentre, per quel che riguarda i processi di immagazzinamento e detossificazione le ricerche sono scarse o quasi assenti. Le uniche informazioni riguardano *O. gammarellus* in cui è stato evidenziato il ruolo chiave svolto dalle cellule dei ciechi ventrali dell'intestino nella detossificazione degli eccessi di Cu, Cd e Zn (Week et al., 1992).

Nonostante l'ampio utilizzo degli anfipodi talitridi come biomonitors, le ricerche nel campo dei biomarkers condotte su queste specie sono quasi assenti e gli unici dati disponibili in letteratura riguardano l'induzione delle metalotioneine in *O. gammarellus* (Mouneyrac et al., 2002).

La capacità dei *Talitrus saltator*, di accumulare metalli in traccia da più matrici è ormai nota, sono invece pochi, se non assenti, gli studi effettuati sulla capacità di queste specie di bioaccumulare composti organici persistenti (POP).

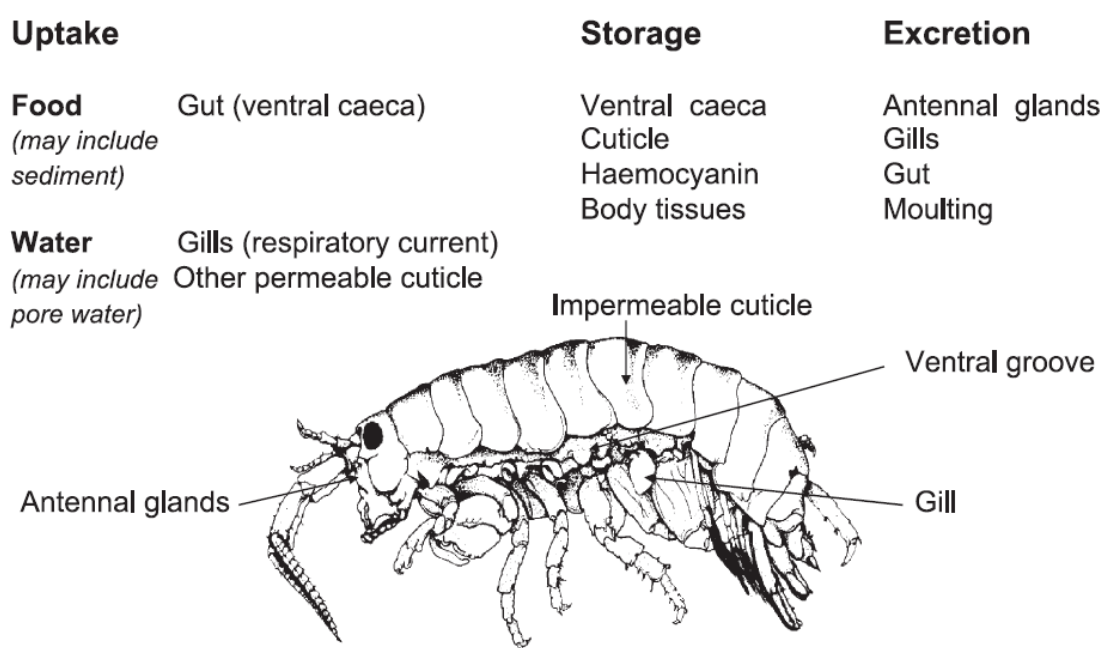


Figura 2.4.2 - Principali vie di assimilazione, immagazzinamento ed escrezione degli anfipodi talitridi

2.4.3 - Campionamento e trattamento dei campioni

Il **primo campionamento** di anfipodi talitridi è stato effettuato nel periodo compreso tra giugno e luglio 2009; sono state raccolte le seguenti specie di anfipodi: *Talitrus saltator* (*T.saltator*), *Orchestia montagui* (*O.montagui*), *Platorchestia platensis* (*P.platensis*), *Talorchestia ugolini* (*T.ugolini*) e *Deshayesorchestia deshayesii* (*D.deshayesii*). Nella tabella 2.4.1 sono riportati i dati di campionamento, nella quale sono specificati le specie di anfipodi, i campioni di sabbia e spiaggiato raccolti.

Data di campionamento	Luogo	Campioni
15/06/09	Solaro	<i>T.ugolini</i> , spiaggia e spiaggiato
16/06/09	Sperone grande	<i>D.deshayesii</i> , sabbia e spiaggiato
25/06/09	F.Morto	<i>T.saltator</i> e sabbia
25/06/09	Calambrone	<i>T.saltator</i> <i>P.platensis</i> , sabbia e spiaggiato
25/06/09	F. Arno	<i>T.saltator</i> e sabbia
30/06/09	Piombino	<i>T.saltator</i> e sabbia
30/06/09	Rosignano	<i>T.saltator</i> e sabbia
09/07/09	F. Albegna	<i>T.saltator</i> e sabbia
09/07/09	Talamone	<i>O.montagui</i> e spiaggiato

Tabella 2.4.1 - Campioni di anfipodi talitridi, sabbia e spiaggiato analizzati

In figura 2.4.3 sono riportati i siti del primo campionamento.

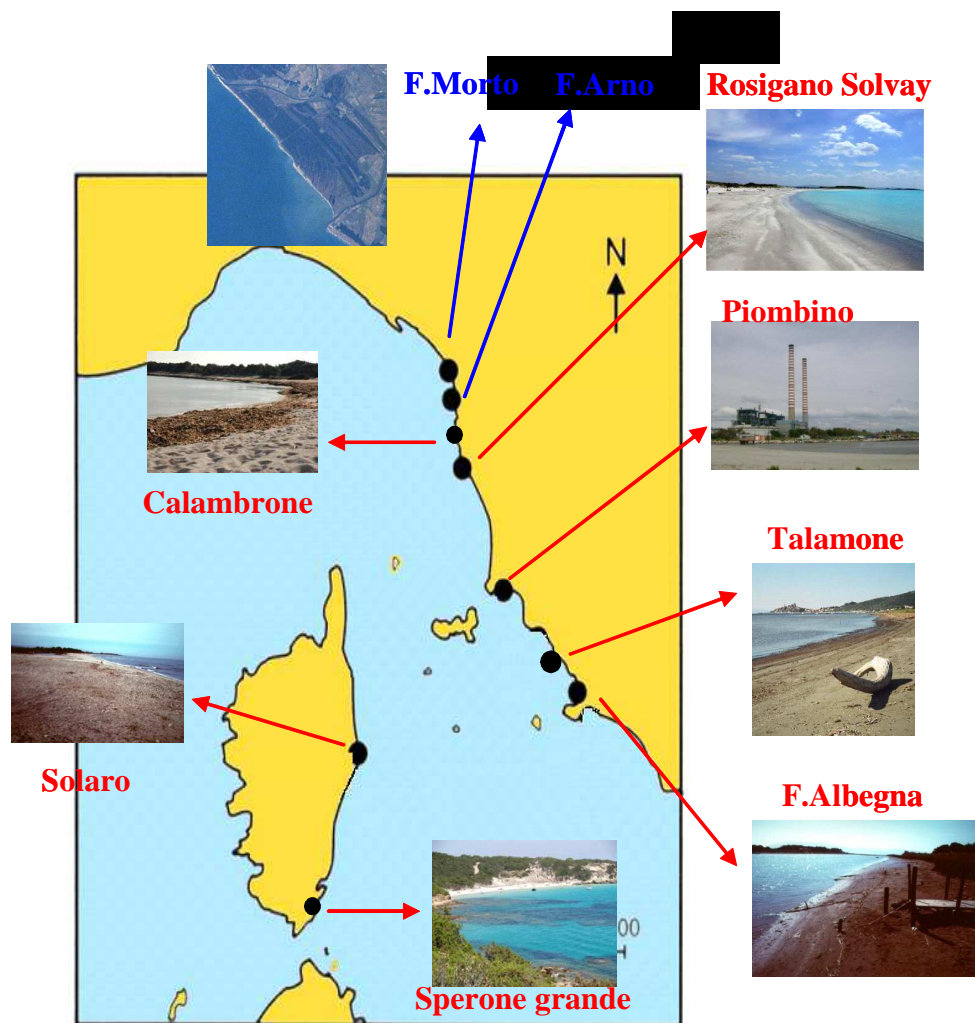


Figura 2.4.3 - Mappa dei siti di campionamento

Gli anfipodi talitridi sono stati raccolti a pochi centimetri di profondità (1-2 cm) nella fascia umida della battigia (*T. saltator*, *T. ugalinii*, *D. deshayesii*) o tra il materiale organico spiaggiato (*P. Platensis*, *O. montagui*) mediante aspiratori entomologici (Fig. 2.4.4). Il metodo e l'attrezzatura di campionamento sono stati approntati da Ugolini et al. (1999).

I campioni raccolti sono stati posti all'interno di vials e conservati a -20°C fino al momento delle analisi.



Figura 2.4.4- Strumento di campionamenti per anfipodi talitridi

Il **secondo campionamento** è stato orientato sulla raccolta di una sola specie di anfipodi talitridi, il *T. saltator*, ed è stato effettuato nel giugno 2010 lungo le coste della Toscana e della Corsica centro-orientale. I dati di campionamento e la mappa con i siti presi in esame sono riportati qui di seguito.

Data di campionamento	Siti di campionamento
11/06/2010	Calambrone, F. Arno, F. Morto
18/06/2010	Piombino, Rosignano, Scarlino
23/06/2010	F. Albegna, F. Ombrone
25/06/2010	Burano, Capalbio, F. Fiora, Feniglia, Ghisonaccia
26/06/2010	Aleria, Tavignano

Tabella 2.4.2 - Campioni di anfipodi talitridi *T.Saltator* analizzati

In figura 2.4.5 sono riportati i siti del secondo campionamento.

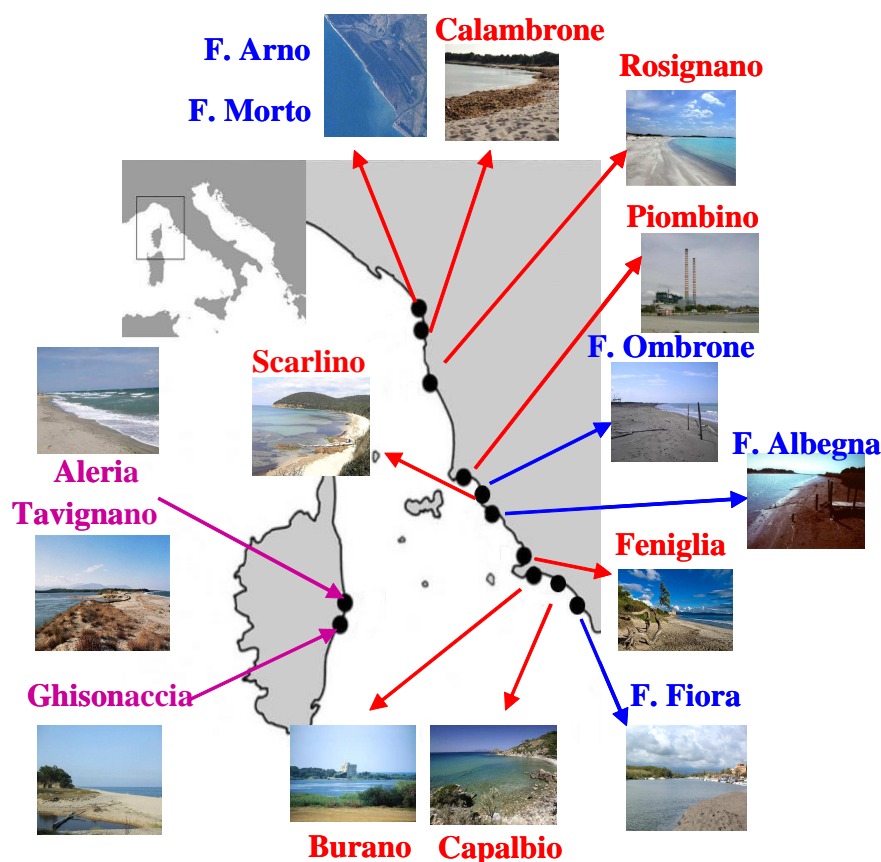


Figura 2.4.5- Mappa dei siti di campionamento

Anfipodi talitridi

I campioni sono stati estratti ottimizzando il metodo proposto da Kannan et al. (1998).

I campioni, precedentemente pesati (circa 1-1,5 g), sono stati macerati finemente insieme a circa 100g di Na₂SO₄ anidro per favorirne la disidratazione. I campioni così trattati, sono stati posti all'interno di un ditale di vetro ed estratti in soxhlet per 16 ore con 400 mL di una miscela Diclorometano:n-Esano 3:1 v/v. Prima dell'inizio dell'estrazione ai campioni è stato addizionato il recovery standard: 100 µL di BDE-119. Gli estratti sono stati concentrati fino ad un volume di 10 mL con rotavapor.

Gli estratti di campioni biologici solitamente contengono alte concentrazioni di lipidi e la quantità di questi viene, dunque, misurata gravimetricamente prima di effettuare la procedura di clean-up, sottoponendo 2 dei 10 mL del campione ad un trattamento di essiccamento in stufa a 60°C per 1 ora.

I rimanenti 8 mL sono successivamente concentrati, sotto leggero flusso di azoto, fino ad un volume di circa 1 mL prima di essere sottoposti alla fase di clean-up.

La colonna per il clean-up utilizzata per gli anfipodi talitridi è stata impaccata, partendo dal basso, con: 2 g di silice, 2 g di silice trattata con acido solforico, 2 g di silice e 10 g di solfato di sodio anidro. Dopo il condizionamento con 100 mL di n-Esano, il campione è stato eluito con 100 mL di n-Esano. L'eluato è stato evaporato con rotavapor fino ad un volume di 5 mL e, successivamente, fino ad un volume di circa 100 µL in bagno di ghiaccio e sotto leggero flusso di azoto. Successivamente 1 µL dell'estratto è stato sottoposto ad analisi gas-cromatografica accoppiata a spettrometria di massa. Le condizioni strumentali sono descritte nel capitolo 2.1.

Sabbia e spiaggiato

Per la determinazione dei PBDE nelle sabbie e negli spiaggiati, è stata eseguita la metodica ISO 22032:2006/E “*Water quality-determination of selected polybrominated diphenyl ethers in sediment and sewage sludge-method using extraction and gas chromatography/mass spectrometry*”. Questa metodica è stata messa a punto in precedenti lavori nei quali sono stati scelti i solventi di estrazione e le procedure di clean-up più adatte per l'estrazione di PBDE in questi tipi di matrice.

Prima dell'estrazione, sia le sabbie che gli spiaggiati, sono stati sottoposti ad un trattamento di liofilizzazione per eliminare l'eventuale acqua presente. Per le sabbie sono bastate poche ore di trattamento mentre per gli spiaggiati, essendo più ricchi di acqua, sono state richieste 24 ore di liofilizzazione.

I campioni di sabbia sono stati pesati (circa 10g), posti all'interno di ditali di vetro ed estratti per in soxhlet per 16 ore con 250 mL di una miscela 4:1 v/v n-Esano:Acetone. I campioni di spiaggiato sono stati macerati con un pestello e, successivamente, pesati (circa 5g) e trattati in maniera analoga ai campioni di sabbia.

Anche in questo caso, prima dell'inizio dell'estrazione, ai campioni sono stati aggiunti 100 µL di standard BDE-119 per valutare la percentuale di recovery. Gli estratti sono stati concentrati fino ad un volume di 5 mL con rotavapor e successivamente ad un volume finale di circa 1 mL in bagno di ghiaccio e sotto leggero flusso di azoto prima di essere sottoposti alla fase di clean-up. La colonna per il clean-up per i campioni di sabbia e spiaggiato è stata impaccata, partendo dal basso con: 2 g di silice, 5 g di silice trattata con idrossido di sodio, 2 g di silice, 10 g di silice trattata con acido solforico, 2 g di silice, 5 g di silice trattata con nitrato di argento e 10 g di solfato di sodio anidro. Per la preparazione delle silici vedi capitolo 2.1.

Dopo aver condizionato la colonna con 50 mL di Diclorometano e 50 mL di Cicloesano, il campione è stato eluito con 50 mL di Cicloesano seguiti da 50 mL di una miscela Cicloesano:Diclorometano 4:1 (v/v). L'eluato è stato evaporato con rotavapor fino ad un volume di 5 mL e, successivamente, fino ad un volume finale di circa 100 µL in bagno di ghiaccio e sotto leggero flusso di azoto. Successivamente 1 µL dell'estratto è stato sottoposto ad analisi gas-cromatografica accoppiata a spettrometria di massa (vedi capitolo 2.1).

2.4.4 - Risultati

Durante la prima campagna di campionamento, giugno-luglio 2009, sono state raccolte specie differenti di anfipodi talitridi allo scopo, come già osservato in precedenza, di evidenziare differenze nell'accumulo di PBDE ad opera della varie specie. Qui di seguito sono riportati i risultati ottenuti per questo primo set di campioni.

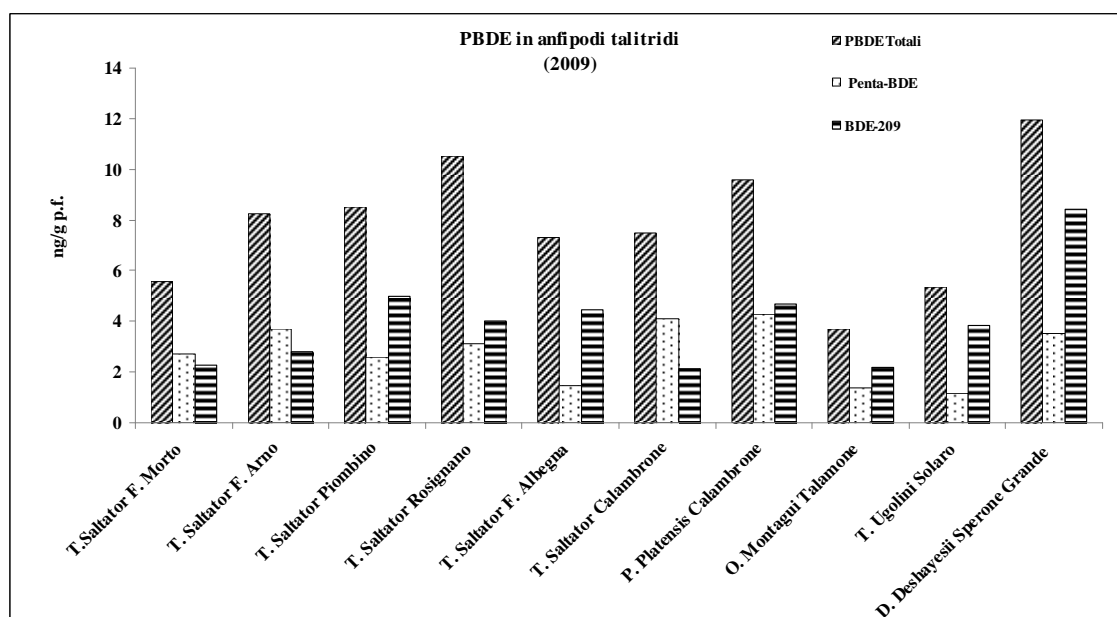


Figura 2.4.6 - PBDE in campioni di anfipodi talitridi (2009)

In figura 2.4.6 sono riportate le concentrazioni della somma totale di PBDE, della miscela Penta-BDE e del deca-BDE, espresse come ng/g p.f. Gli anfipodi talitridi mostrano concentrazioni di PBDE totali tra 3,72-11,95 ng/g p.f., il deca-BDE tra 2,15 e 8,43 ng/g p.f. e la miscela Penta-BDE tra 1,16 e 4,29 ng/g p.f.

Il congenere generalmente più abbondante in assoluto in tutti i campioni analizzati è risultato essere il BDE-209. Nel grafico 2.4.7 si possono osservare le percentuali del deca-BDE in rapporto alla somma di tutti gli altri congeneri; il BDE-209 risulta generalmente molto abbondante e, in alcuni casi, anche superiore alla somma di tutti gli altri PBDE. Si osserva per questo congenere un andamento opposto rispetto a quanto riscontrato per la miscela Penta-BDE. Infatti le concentrazioni più elevate di BDE-209 si osservano, per quanto riguarda i *T. saltator*, nei campioni prelevati presso Piombino e fiume Albegna e, nel caso delle altre specie analizzate, in *O. montagui*, *T. ugolini* e *D. deshayesii* raccolti rispettivamente, a Talamone, Solaro e Sperone Grande.

Si può notare come per questi campioni le concentrazioni registrate per la miscela Penta-BDE siano invece minime (vedi grafico 2.4.8), questo potrebbe indicare immissioni recenti di BDE-209, il quale non ha subito ancora processi degradativi e di trasformazione in congeneri a più basso grado di bromurazione. Non stupiscono questi andamenti poiché Piombino e Albegna sono due siti locati in aree ad elevato impatto antropico e industriale. Risulta inaspettato, invece, il dato relativo ai campioni di Talamone, Solaro e Sperone Grande, dove l'influenza delle attività industriali è decisamente ridotta; si potrebbe ipotizzare, in questo caso, che valori così elevati siano collegabili all'impatto antropico relativo al settore turistico e all'appartenenza a specie differenti.

Nei campioni di *T. saltator* prelevati a Calambrone e presso le foci del fiume Morto e Arno si registrano picchi minimi per la miscela Deca-BDE e picchi massimi per la Penta-BDE. Questo andamento indicano immissioni provenienti da fonti lontane per la miscela Deca-BDE e immissioni lontane nel tempo per la miscela Penta-BDE. Bisogna ricordare che il BDE-209, attraverso meccanismi per la maggior parte noti (es. degradazione termica e fotolitica) e ancora incogniti (es. degradazione microbica, metabolica), tende a degradarsi in congeneri inferiori, in particolare BDE-47, BDE-99 e BDE-100. È possibile, dunque, pensare che, in alcuni casi, le concentrazioni relative ai congeneri costituenti le miscele Penta-BDE e Deca-BDE siano fortemente influenzate da questi processi degradativi, in particolar modo da quelli originati dal metabolismo stesso degli anfipodi talitridi.

I risultati hanno evidenziato, inoltre, la presenza dei congeneri principali della miscela Penta-BDE (BDE-47, BDE-99, BDE-100) in tutti i campioni di biota analizzati mentre il BDE-183, congenere principale della miscela Octa-BDE, è stato determinato in un solo campione, il *T. saltator* a Rosignano. Si deve tenere in considerazione il fatto che i campioni analizzati sono

relativi al periodo estivo durante il quale, nelle località costiere, le frequentazioni turistiche potrebbero incidere in maniera significativa sulle concentrazioni trovate di questi congeneri.

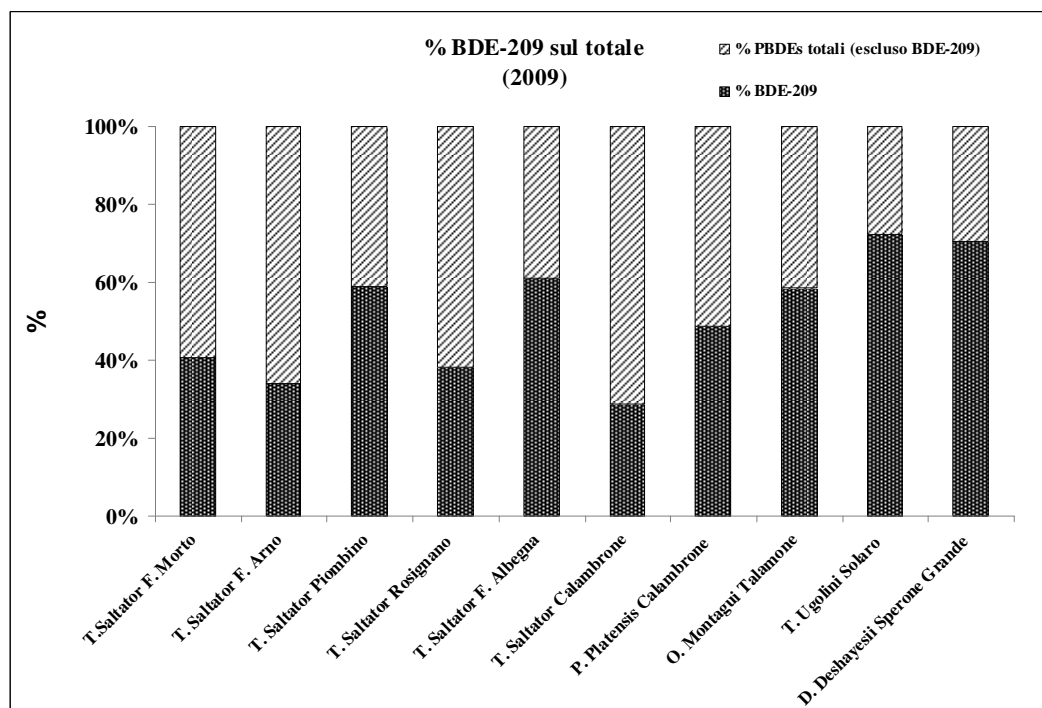


Figura 2.4.7 - % BDE-209 sul totale dei congeneri

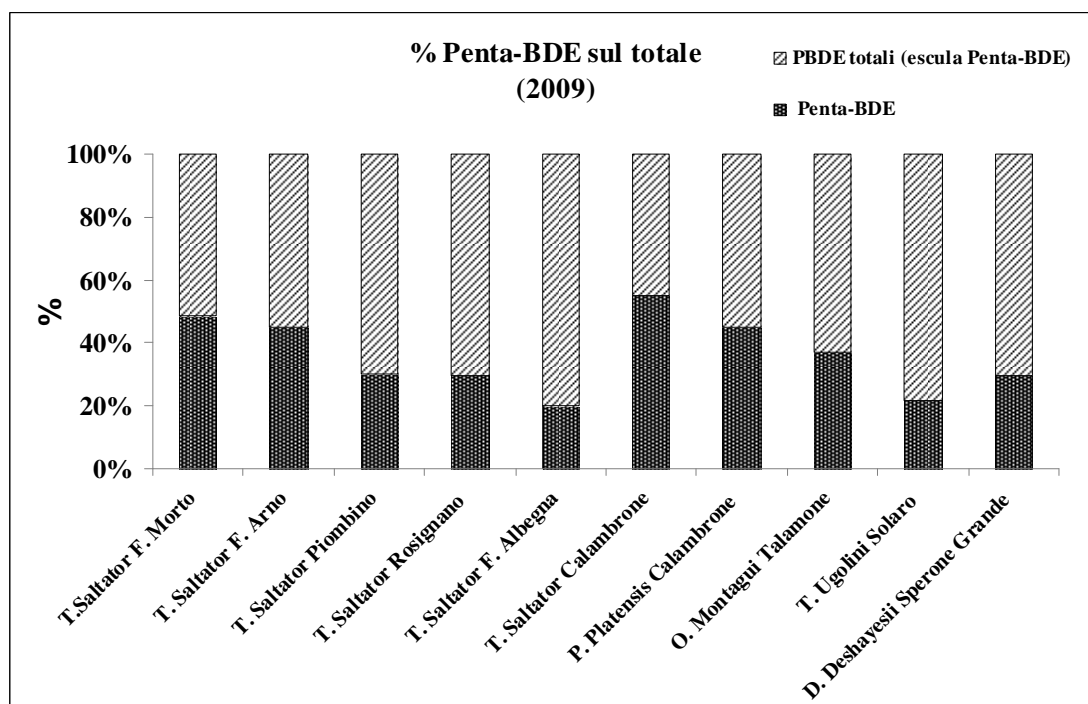


Figura 2.4.8 - % della miscela Penta-BDE sul totale dei congeneri

Durante questa campagna di campionamento sono stati prelevati anfipodi talitridi di specie diverse, nel sito di Calambrone sono stati prelevati *Talitrus saltator* e *Platorchestia platensis* nello stesso giorno. Mentre la miscela Penta-BDE non ci sono molte differenze, la miscela Deca-BDE e il totale dei PBDE presentano valori non comparabili, vedi grafico 2.4.6. *Platorchestia platensis* ha mostrato livelli di concentrazione maggiori per la miscela Penta-BDE, 4,30 ng/g p.f., al *Talitrus saltator*, 4,12 ng/g p.f.; nel caso del BDE-209 questa differenza è più marcata 4,67 ng/g p.f. e 2,15 ng/g p.f.. È ipotizzabile, dunque, che l'uptake di composti organici in queste due specie di anfipodi talitridi sia differente. Restano da comprendere i meccanismi fisiologici che ne stanno alla base allo scopo di poter prevedere i fattori di assorbimento (es. assimilazione, distribuzione, origine, etc.) di composti organici semivolatili da parte di queste specie.

Questo ci ha fatto capire come sia difficile fare dei confronti tra specie diverse, quindi è necessario scegliere tra queste specie quella che presenta più vantaggi per i nostri obiettivi. Vista la più larga diffusione dei *Talitrus saltator* nelle zone contaminate da noi studiate, la facilità di reperibilità e la presenza di tutti i congeneri bioaccumulati in questi organismi, siamo arrivati alla conclusione che tra gli anfipodi talitridi i *Talitrus saltator* sono risultati essere miglior biomonitor per PBDE.

Nelle figure 2.4.9 e 2.4.10 sono riportate le concentrazioni della somma di tutti i PBDE investigati, la miscela Penta-BDE, il BDE-209 e il totale dei congeneri. Abbiamo messo in relazione le concentrazioni dei PBDE relative ai talitri e alle due matrici ambientali, ma non si osservano correlazioni significative. Tra le concentrazioni determinate nei campioni di anfipodi talitridi sopralitorali (*T. saltator*) e nei campioni di sabbia corrispondenti si ottiene $R^2 = 0,014$, questo a conferma del fatto che la matrice sabbia è sottoposta a molteplici fattori che influiscono in maniera determinante sulle concentrazioni dei composti organici presenti nella matrice stessa.; risultati molto simili sono stati ottenuti anche per il materiale spiaggiato.

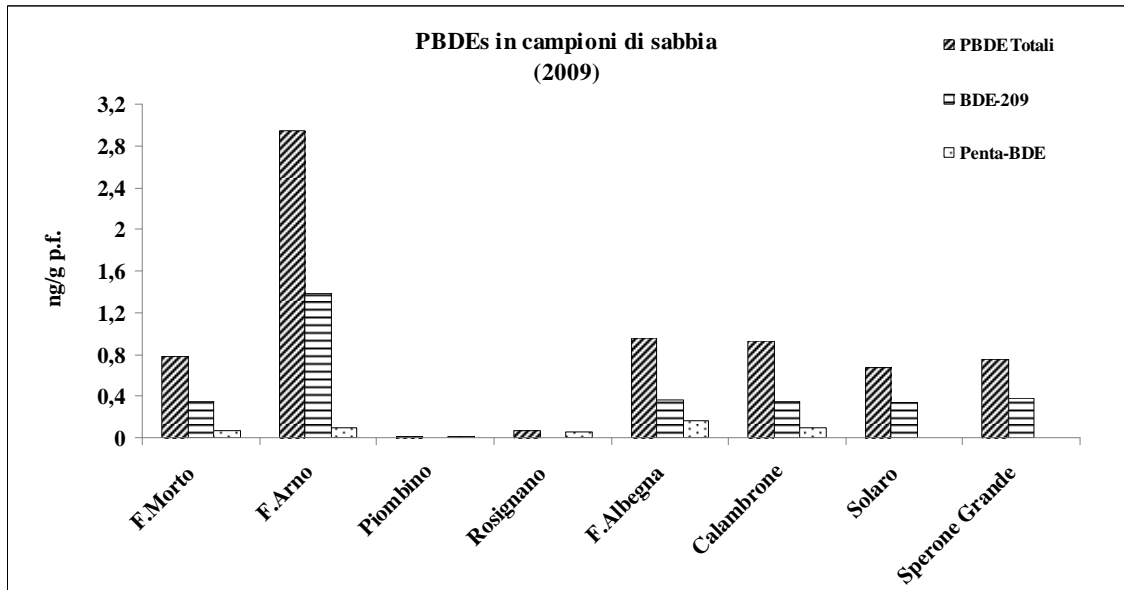


Figura 2.4.9 - PBDE in campioni di sabbia

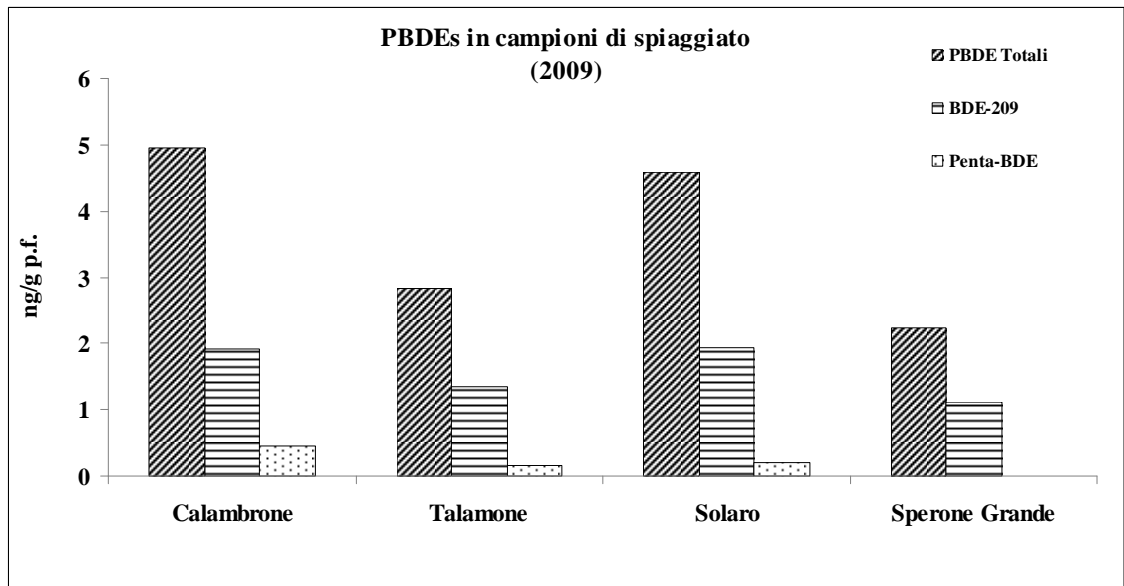


Figura 2.4.10 - PBDE in campioni di spiaggiato

Per quanto riguarda i risultati relativi al secondo campionamento, condotto nel giugno 2010, e relativi alla sola specie del *Talitrus saltator*, la figura 2.4.11 illustra le concentrazioni di PBDE totali, della miscela Penta-BDE e del BDE-209, i quali variano tra un range di 1,36-25 ng/g p.f., 0,1-4,18 ng/g p.f. e 0,91-23,8 ng/g p.f. rispettivamente.

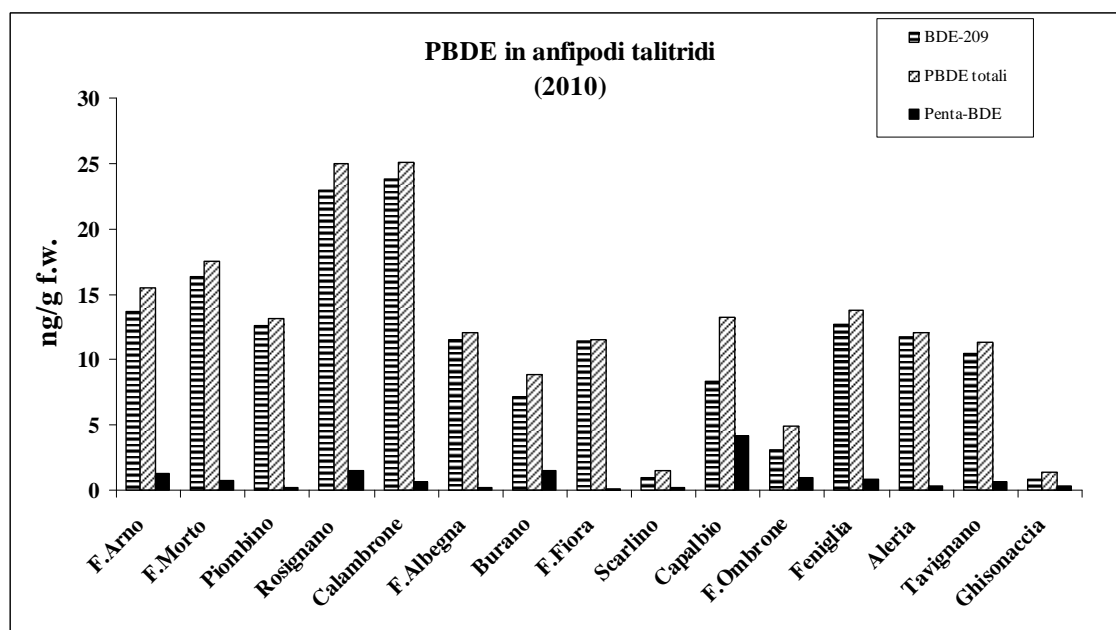


Figura 2.4.11 - PBDE in campioni di anfipodi talitridi (2010)

Il campione che ha riportato il maggiore contenuto di questi inquinanti è Rosignano, stesso risultato del campionamento del 2009, questo va a confermare la forte contaminazione di questa area industrializzata.

Anche per questo set di campioni, come già osservato per il precedente set di dati, il BDE-209 rappresenta un caso particolare. Le maggiori concentrazioni di questo congenere sono state riscontrate nei campioni raccolti a Calambrone (23,80 ng/g f.w.) ed a Rosignano (22,92 ng/g f.w.) mentre i campioni più poveri di BDE-209 sono quelli relativi al fiume Albegna (0,72 ng/g f.w.), a Ghisonaccia (0,91 ng/g f.w.) ed a Scarlinto (0,92 ng/g f.w.). E' facile notare che le concentrazioni di questo congenere risultano generalmente elevate e superiori alla somma di tutti gli altri PBDE, vedi figura 2.4.12. Il contributo percentuale del BDE-209 sui PBDE totali risulta essere in media circa l'82%. Tali risultati sono in parte attesi, in quanto la miscela Deca-BDE risulta l'unica attualmente in uso poiché non regolamentata da alcun organo ufficiale.

Una differenza poco marcata tra BDE-209 e la somma degli altri congeneri la si può notare nei campioni di Scarlinto, Capalbio e fiume Ombrone, questo andamento può essere spiegato dall'influenza della degradazione metabolica, microbica, termica e fotolitica cui il BDE-209 è soggetto.

Molto importante è anche il contributo della miscela Penta-BDE al contenuto totale di PBDE, questa è infatti presente in quasi tutti i campioni, vedi figura 2.4.13. Vista l'importanza della presenza dei congeneri della miscela Penta-BDE, poiché altamente tossici, risulta interessante andare a valutare quale di questi è presente in maggiore quantità. I congeneri BDE-47 e BDE-99, i maggiori costituenti della miscela Penta-BDE, sono stati determinati in ogni campione analizzato, mentre i congeneri BDE-153 e BDE-154 sono scarsamente presenti. Per quanto

riguarda il congenere BDE-183, componente principale della miscela Octa-BDE, è stato individuato nel solo campione di Capalbio, ciò riflette il suo minore utilizzo.

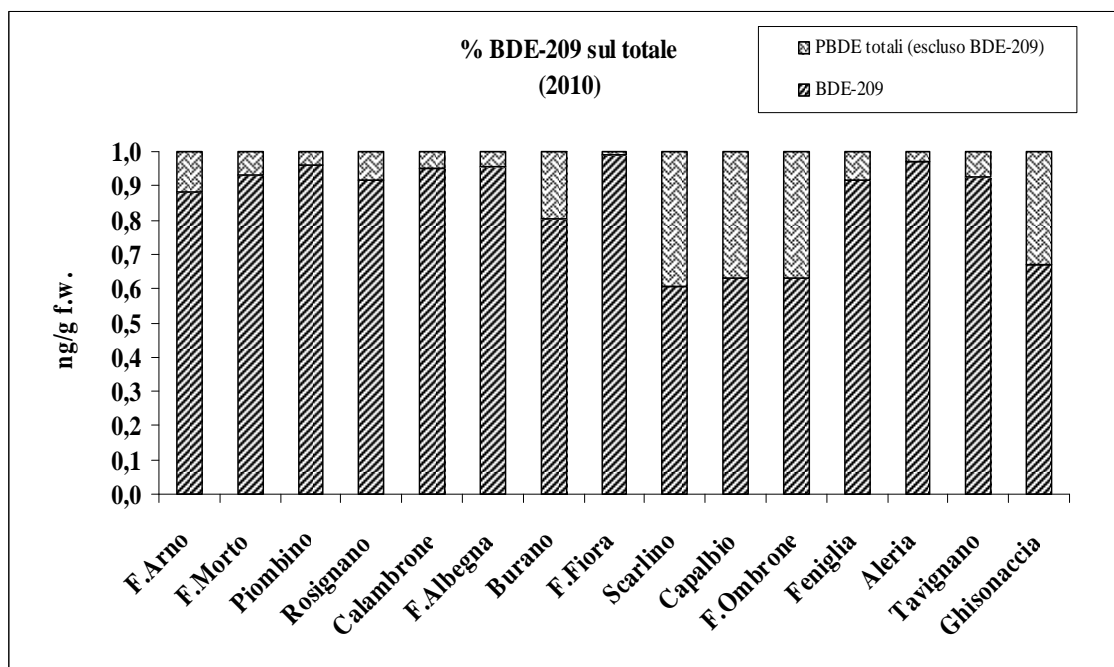


Figura 2.4.12 - % BDE-209 sul totale dei congeneri

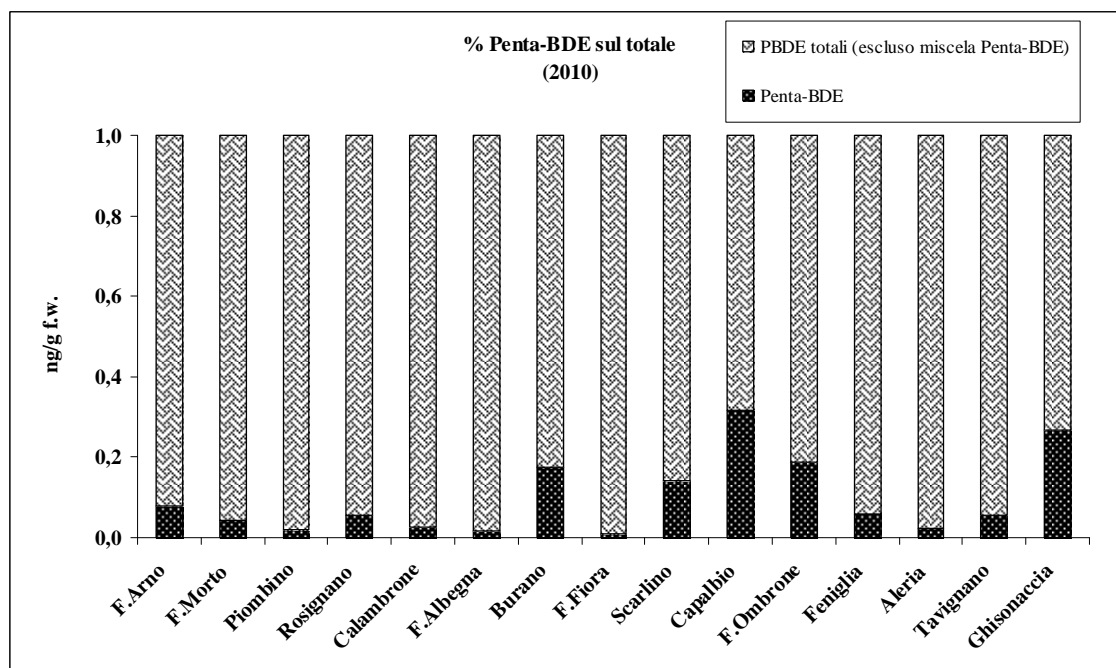


Figura 2.4.13 - % Penta-BDE sul totale dei congeneri

Di seguito viene riportato un confronto tra i dati relativi alla campagna di campionamenti precedente (giugno-luglio 2009) e a quella attuale, vedi figura 2.4.14.

Dal grafico si osserva come le concentrazioni di PBDE determinate nella seconda campagna di campionamento siano generalmente più elevate rispetto al 2009 ad indicare la probabile influenza dei fenomeni legati al maggior impatto antropico; questa differenza risulta meno netta nel campione raccolto a Piombino.

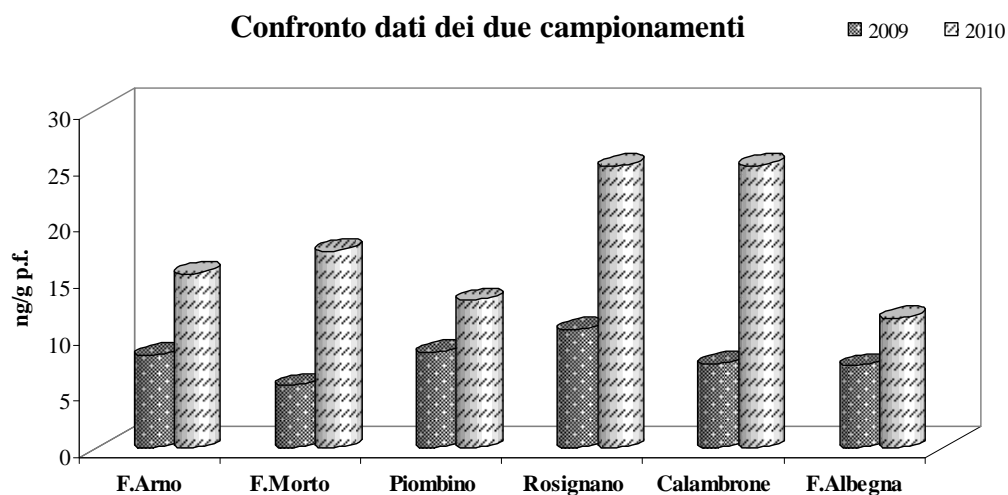
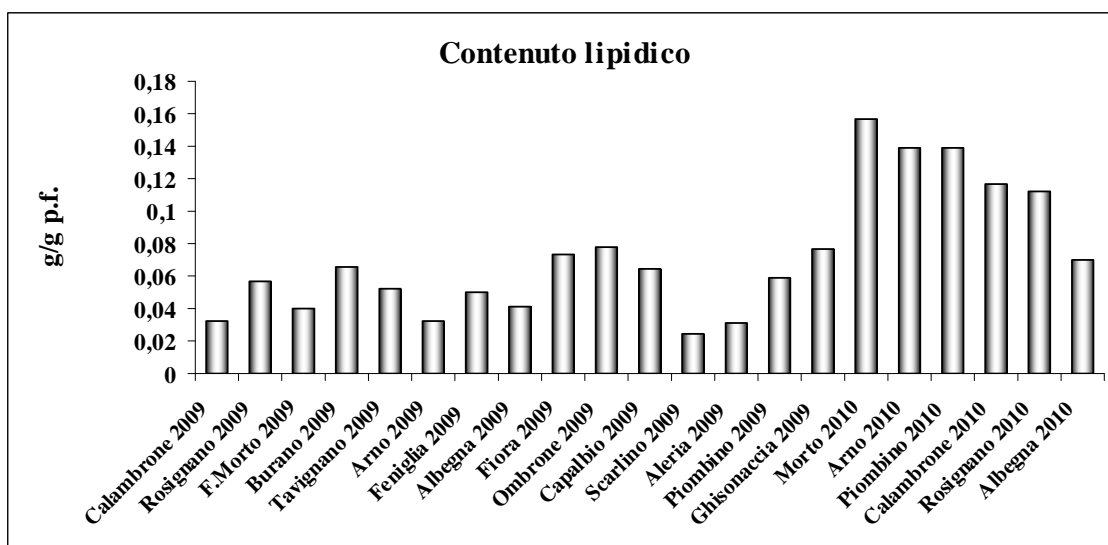


Figura 2.4.14 - Confronto tra le concentrazioni di PBDE totali nel 2009 e nel 2010.

Un parametro significativo ed interessante da considerare per integrare le conoscenze ottenute riguardo alla distribuzione di PBDE nei campioni, è la determinazione del contenuto lipidico, vedi figura 2.4.15. Si deve ricordare, infatti, che questa classe di composti, per le loro caratteristiche chimico-fisiche di lipofilicità, tendono ad accumularsi nei tessuti grassi.

Abbiamo, così, plottato i dati relativi al contenuto lipidico totale e le concentrazioni dei vari congeneri, i risultati non hanno però evidenziato nessuna correlazione significativa tra i vari parametri. Per approfondire la relazione tra le concentrazioni dei contaminanti organici lipofilici nei tessuti animali e il loro contenuto lipidico, sarebbe importante poter analizzare nel dettaglio le varie classi lipidiche, ipotizzando una affinità maggiore per specifiche classi.



**Figura 2.4.15 - Contenuto lipidico totale nei campioni analizzati
(espresso come g di lipidi su g di campione peso fresco)**

Dopo aver studiato i livelli delle concentrazioni di PBDE in campioni di anfipodi talitridi e nelle matrici prelevate dall'ambiente in cui essi vivono, è possibile affermare che gli anfipodi talitridi sopralitorali sono un valido biomonitor per rilevare la contaminazione da PBDE nelle zone costiere. Grazie alla loro capacità di accumulare e metabolizzare questi inquinanti e presentando tutte le caratteristiche principali tipiche di un buon biondicatore, essi ci possono aiutare a capire con buona approssimazione lo "stato di salute" delle nostre coste .

3 - Presenza di PBDE in zone a basso grado di antropizzazione

3.1 - Presenza di PBDE in Artico: studio delle matrici neve e aria

I PBDE sono composti ubiquitari, ritrovati in luoghi molto lontani dalle sorgenti e i dati di monitoraggio, raccolti in diversi anni, hanno dimostrato che il trasporto a lungo raggio è possibile per questo tipo di composti.

Recenti lavori hanno descritto come i livelli di polibromodifenileteri (PBDE), che vengono dispersi nelle zone tropicali e subtropicali, stanno crescendo in maniera esponenziale nei vari comparti ambientali (*de Wit, 2002; Hites, 2004*). Usando diversi modelli, Wania and Dugani nel 2003 videro una similitudine di comportamento tra i tetra e i penta-BDE e gli esa e eptaclorobifenili, anche per questi composti bromurati, dunque, era possibile il trasporto a lungo raggio con accumulo nelle regioni artiche.

Le prime segnalazioni della presenza di BRF in Artico risalgono al 1987, quando PBDE a basso grado di bromurazione e PBB furono ritrovati nei tessuti muscolari dell' uria di Brunnich (*Uria lomvia*) (130 ng/g lipid weight – lw) e nel 1981 nel grasso di foca (*Phocahispida*) (40 ng/g lw) (*Jansson et al., 1987*). Nel coregone raccolto nel lago Storvindeln, situato sulle montagne svedesi vicino Ammarna, nel 1986 vennero ritrovati i BDE-47, -99, -100 (PBDE-8.3 pg/m³) e HBCD (6.1 pg/m³). Anche se questi dati dimostrarono l'evidenza della presenza di PBDE in Artico e di un innegabile trasporto a lungo raggio, solo recentemente ne è stato studiato un andamento spaziale e temporale in questa regione del pianeta.

L'Artico, grazie al sua particolare posizione geografica e condizioni climatiche, viene considerato un importante rilevatore per la valutazione della persistenza e del bioaccumulo dei PBDE e, in generale, di tutti i POP. Le basse temperature favoriscono la persistenza dei composti organici rispetto agli ambienti temperati e tropicali, provocando un inevitabile accumulo in tutti i comparti ambientali. Nella valutazione della contaminazione di questa regione va considerato che le zone che la compongono possono avere caratteristiche diverse tra loro, a seconda della loro locazione. Le regioni artiche che si trovano nel Mare di Barents, a nord della Norvegia e ad ovest della Russia, risentono delle sorgenti di POP presenti nei territori limitrofi; mentre le zone alle più alte latitudini sono molto più remote, non risentono, infatti, dell'influenza del trasporto a lungo raggio degli inquinanti. In alcune regioni artiche sono presenti insediamenti umani e piccoli centri abitati, sorti grazie allo sfruttamento di risorse come le miniere di carbone e la pesca, e sviluppati in seguito con la ricerca e il turismo; la presenza

dell'uomo con le sue attività rappresenta un'inevitabile sorgente locale di contaminanti, da tenere presente durante le valutazioni relative alla contaminazione di queste aree.

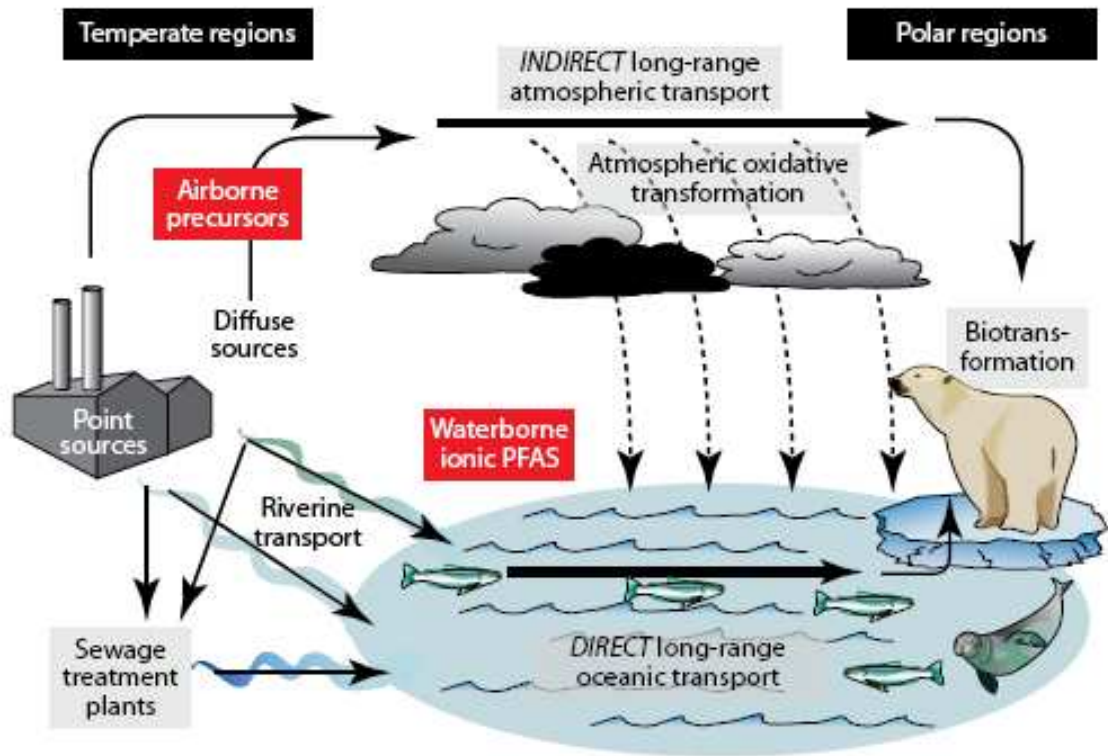


Figura 3.1.1 - Schema del trasporto a lungo raggio (LRAT) dalle fonti alle medie latitudini verso l'Artico

3.1.1 – Campionamento

Sono stati condotti contemporaneamente campionamenti di neve e aria lungo l'Adventalen Fjord vicino Longyearbyen nelle Isole Svalbard, Norvegia, durante la campagna di campionamento avvenuta tra il 16 e il 26 febbraio 2009.

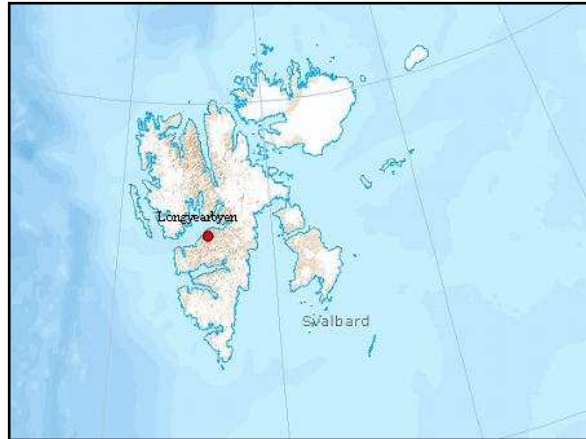


Figura 3.1.2 - Longyearbyen, Isole Svalbard, Norvegia

In figura 3.1.3 sono riportati i siti di campionamento. Nel sito 1 sono stati raccolti i campioni di aria, il campionario è stato posizionato presso il vecchio osservatorio di aurore boreali, ormai adibito a questo tipo di campionamento, poiché attrezzato con corrente elettrica. Il sito 2 indica il luogo dove è stata raccolta la neve, poco lontano dal campionario di aria ma protetto dal passaggio di motoslitte.

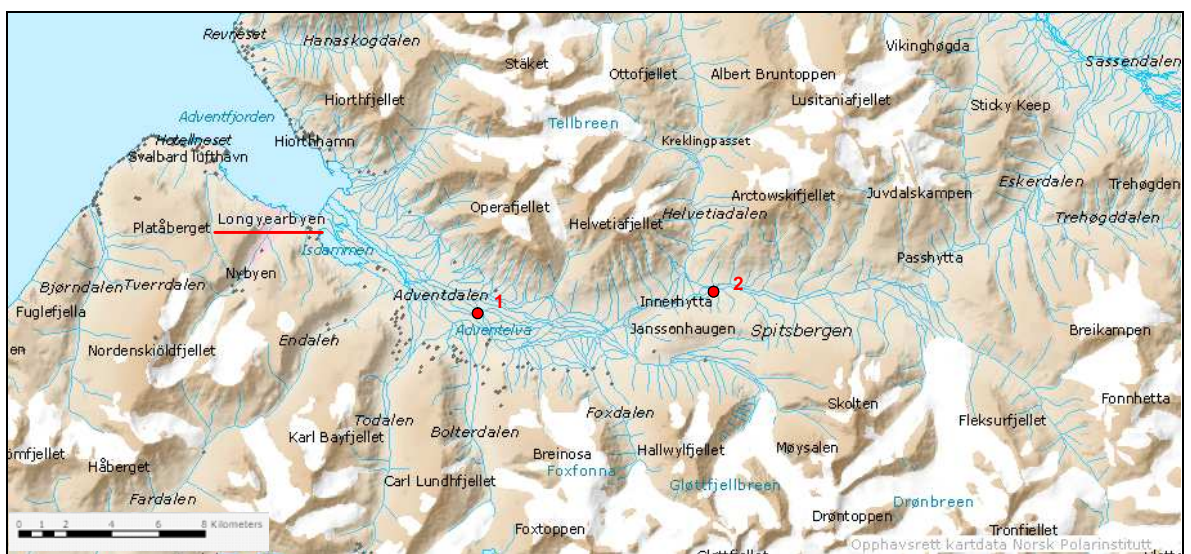


Figura 3.1.3 - Siti di campionamento nell' Adventalen fjord, Longyearbyen

I campionamenti atmosferici sono stati raccolti per un periodo di 48 ore allo scopo di avere una quantità di PBDE sufficiente per la loro determinazione con campionatore ad alto volume. Nella tabella 3.1.1 sono riportati i campioni prelevati.

Campione	Inizio campionamento	Fine campionamento
1	18/02/2009	20/02/2009
2	20/02/2009	22/02/2009
3	22/02/2009	24/02/2009
4	24/02/2009	25/02/2009
5	25/02/2009	26/02/2009

Tabella 3.1.1 – Campioni di aria

Per il campionamento di neve sono state utilizzate pale di acciaio inossidabile, precedentemente trattate con acetone ed acqua MilliQ per eliminare la presenza di possibili contaminanti, è stata prelevata solo la parte più superficiale del manto nevoso, circa 3 cm, che è quella direttamente a contatto con l'atmosfera e di conseguenza la più suscettibile all'equilibrio termodinamico che si instaura direttamente tra i POP adsorbiti sui cristalli di neve e quelli in atmosfera. Nella tabella 3.1.2 sono riportati i campioni raccolti di neve.

Campione	Data
1	18/02/2009
2	19/02/2009
3	20/01/1900
4	22/02/2009
5	23/02/2009
6	24/02/2009

Tabella 3.1.2 – Campioni di neve



Figura 3.1.4 – Campionamento della neve

3.1.2 - *Trattamento campioni*

Campioni di aria

Una porzione dei filtri in fibra di quarzo, ovvero mezzo filtro, è stata estratta in soxhlet per 16 ore con diclorometano dopo aggiunta di 1 ml di una soluzione di recovery standard di BDE-77. Gli estratti sono stati concentrati mediante rotavapor fino ad un volume di circa 5 ml, e poi, in bagno di ghiaccio, sotto leggero flusso di azoto, fino ad un volume di circa 1 ml, prima di procedere alla fase di clean-up. Gli estratti sono stati purificati utilizzando una colonna in vetro impaccata con circa 8 g di silice attivata con tecnica slurry, e solfato di sodio. La silice usata è stata precedentemente trattata in soxhlet per circa 16 ore con diclorometano, mentre il solfato di sodio è stato precedentemente trattato in muffola a 400°C per circa 8 h. Una volta che le colonne sono state impaccate e condizionate con esano, il campione è stato eluito con 25 ml di esano e con 50 ml di una miscela costituita da esano:diclorometano (4:1 v/v). L'eluato è stato raccolto in un pallone e concentrato prima fino ad un volume di circa 5 ml con rotavapor e poi tra 100 µl e 500 µl circa sotto leggero flusso di azoto in bagno di ghiaccio.

Successivamente 1 µl dell'estratto è stato sottoposto ad analisi gas-cromatografica accoppiata a spettrometria di massa per la rivelazione e quantificazione dei PBDE, per quanto riguarda le condizioni strumentali utilizzate vedi capitolo 2.3.

Campioni di neve

I campioni di neve, dopo essere stati raccolti sono stati portati nei laboratori dell'università norvegese presente sulle Isole Svalbard (UNIS). Dopo lo scioglimento avvenuto a temperatura ambiente, i campioni disciolti sono stati filtrati in situ mediante l'apparato riportato in figura 3.1.5



Figura 3.1.5 - Apparato di filtrazione



Figura 3.1.6 - Residuo di materiale particolato dei nostri campioni

L'apparato di filtrazione è costituito principalmente da un contenitore in acciaio dove viene messa la neve campionata, due dischi in teflon tra i quali viene posizionato un filtro in quarzo e una colonna in acciaio impaccata con una resina di Amberlite XAD-2. La XAD-2 è una resina polistirenica, reticolata con divinilbenzene con particelle da 20 a 60 mesh, non polare e con porosità del 42%. Tale resina, prima dell'utilizzo, è stata purificata mediante l'ASE con cicli di lavaggio con soventi a polarità diversa.

Il campione di neve sciolta passa dall'interno del contenitore ai due dischi grazie ad un flusso di azoto ultrapuro, questo crea pressione all'interno del dispositivo e il campione, in tali condizioni, è forzato ad attraversare un tubo in teflon che collega il contenitore all'unità di filtrazione. L'unità di filtrazione è costituita da un disco contenente un filtro in fibra di quarzo dove viene raccolto il particolato; l'acqua filtrata passa successivamente attraverso la colonna impaccata con XAD, che ha il compito di trattenere i composti organici lasciando passare l'acqua. La filtrazione è stata eseguita a una pressione costante di 200 ml/min, questa pressione consente di ottenere una velocità di filtrazione tale da permettere il completo adsorbimento dei POP sulla resina.

Terminata la filtrazione ci siamo accorti che sul fondo del contenitore in acciaio rimaneva un residuo abbondante di materiale particolato, vedi figura 3.1.6.

La presenza inaspettata di questo deposito per tutti i campioni prelevati, potrebbe essere spiegata dall'influenza di miniere di carbone, alcune in disuso e altre attive, vicino al sito di campionamento. Il residuo di materiale particolato è stato così recuperato attraverso una filtrazione basata sullo stesso funzionamento dell'imbuto Buchner, usando dei filtri più piccoli.

I filtri sui quali è stato raccolto il materiale particolato, sia quelli usati per la filtrazione dell'acqua che quelli più piccoli per il residuo, sono stati estratti in soxhlet mediante due estrazioni successive di 24 ore ciascuna con acetone e esano. Allo scopo di quantificare il recupero della procedura ogni campione prima dell'estrazione è stato addizionato un recovery standard BDE-77.

I campioni filtrati sono stati estratti in soxhlet mediante due estrazioni successive di 24 ore ciascuna con acetone e esano, allo scopo di quantificare il recupero della procedura ogni campione prima dell'estrazione è stato addizionato con un recovery standard (BDE-77). L'estratto in acetone è stato contro-estratto per tre volte in imbuto separatore con 100ml di esano e 100 ml di acqua con grado di purezza HPLC già pre-estratta con esano.

Gli estratti della fase disciolta e particolata sono stati concentrati con rotavapor e sotto flusso di azoto fino ad 1ml, sono stati frazionati su una colonna in vetro impaccata con 8 g di gel di silice 100-200HR (Supelco) e esano con tecnica slurry. La silice utilizzata è stata precedentemente purificata mediante lavaggio in soxhlet con diclorometano per 48 ore e conservata, fino al momento dell'utilizzo, in stufa a 150°C. I composti organici sono stati frazionati ed eluiti dalla colonna prima con 25 ml di esano ed in seguito con 50 ml di una miscela di

esano/diclorometano (4/1 v/v) e raccolti nel medesimo pallone .

Gli estratti sono stati riuniti e concentrati e successivamente analizzati al GC-NCI-MS con le condizioni strumentali descritte nel capitolo 2.1.

3.1.3 - Risultati

Aria

Nel grafico 3.1.7 sono riportati i risultati relativi ai campioni di aria prelevati nel sito 1 situato nell'Adventalen fjord (vedi figura 3.1.3); la concentrazione della somma di tutti congeneri investigati varia tra un minimo di 3,53 pg/m³ e un massimo di 60,44 pg/m³, con una media di 19,24 pg/m³ .

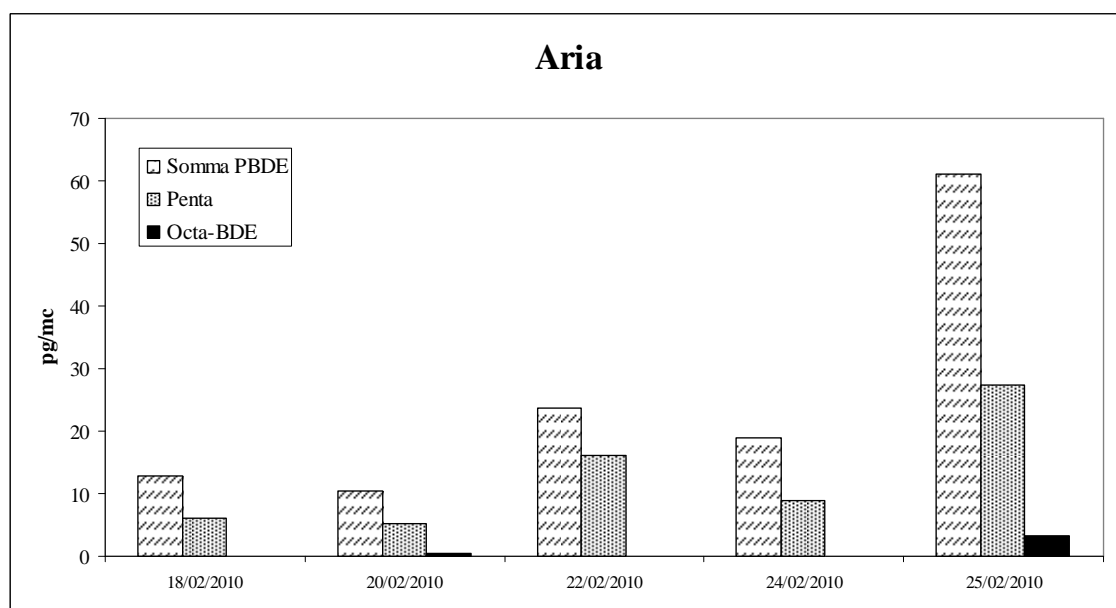


Figura 3.1.7 - Concentrazioni di PBDE nell'aria

Come si può vedere dal grafico 3.1.7 durante i primi giorni di campionamento i livelli delle concentrazioni risultano essere piuttosto bassi, mentre si nota un incremento nei giorni successivi. Questo andamento riflette gli eventi meteorologici avvenuti durante il periodo di campionamento. Durante i giorni 18-20 febbraio si sono registrate temperature poco al di sotto dello 0°C, piuttosto elevate per essere in febbraio, l'umidità era piuttosto alta e frequenti erano le piogge; la pioggia, anche se non particolarmente abbondante, ha fatto precipitare gli inquinanti purificando l'aria, per questo motivo ritroviamo valori bassi di PBDE. Dal 20 febbraio il tempo è iniziato a cambiare, le temperature sono precipitate a circa -20° durante il giorno e si sono verificate bufere piuttosto violente il 22 febbraio, la mancanza di piogge e le

neviccate ventose, ma non abbondanti, hanno determinato un innalzamento dei valori delle concentrazioni dei nostri composti ricercati.

I livelli delle concentrazioni da noi trovate sono in linea con i dati in letteratura. Nel lavoro di Su et al. del 2007 campioni prelevati ad Alert, Canada, tra il 2002 e il 2004, presentavano concentrazioni relative alla somma di 14 PBDE, escluso il BDE-209, tra 0,40 e 47 pg/m^3 , con una media di 7,7 pg/m^3 (fase gassosa e particolato). Wang et al. nel 2005 riporta concentrazioni medie, relative alla somma di 11 PBDE, di 17,3 pg/m^3 (2.58–60.9 pg/m^3) per campioni di aria prelevati sull'Oceano Artico tra luglio e settembre 2003.

Andando indietro nel tempo, dati di archivio riportati da de Wit et al. nella sua overview sui PBDE del 2002 mostrano concentrazioni della miscela Penta-BDE inferiori a dati più recenti. Nella tabella sono riportate le concentrazioni dei congeneri della miscela Penta-BDE, ovvero il BDE-47, -99 e -100, ritrovate in varie regioni dell'Artico tra il 1990 e il 2009, a confronto con le concentrazioni trovate in questo studio. Si può bene notare come i valori di PBDE siano molto alti fino al 2003 mentre sono molto bassi quelli ritrovati nei campioni più recenti, come quelli del nostro progetto; questo andamento riflette l'utilizzo che l'uomo ha fatto di questa miscela negli anni e dell'improvvisa interruzione nella produzione e nell'uso nel 2004.

LUOGO	ANNO	BDE-47	BDE99	BDE-100
Ammarnas	1990-91	6,3	1,6	0,4
Dunai, Russia	1994-95	3,7	9,3	2,8
Alert, Canada	1994-95	64	128	21
Tagish, Canada	1994-95	112	232	35
Iceland	2002	<6.3	<9.8	<1.9
Northern, Norway	2002	<6.3	<9.8	<1.9
Svalbard	2002	6,5	14,5	2,3
Arctic (from 37°N to 80°N)	2003	7,21	4,95	0,98
Questo lavoro	2009	2,92	3,96	1,28

Tabella 3.1.3 - Dati di letteratura (pg/m^3)

Confrontiamo adesso le abbondanze relative dei vari congeneri, calcolate relativamente alla concentrazione totale dei PBDE trovata. Nella tabella 3.1.4 sono riportati le concentrazioni relative dei congeneri più importanti trovati nei nostri campioni, per quanto riguarda i costituenti la miscela Penta-BDE, il BDE-47 si ritrova con una media percentuale di 11,48%, il BDE-99 di 15,60%, il BDE-100 di 4,76%, il BDE-153 di 7,35% e il BDE-154 di 12,16%. Nella pubblicazione di Su et al. del 2007 è emerso che le abbondanze relative risultano il 31% per BDE-47, il 29% per BDE-99 e il 2–6% per l'insieme dei congeneri BDE-28/33, -100, -153, e -

154. Il principale costituente della miscela Octa-BDE è stato ritrovato solo occasionalmente in alcuni campioni in entrambi i lavori.

Nei nostri campioni non c'è un congener che domina come concentrazioni, nel lavoro di Su et al., invece, il BDE-47 e il BDE-99 si differenziano in modo particolare rispetto agli altri. Questa variazione è dovuta a fenomeni di degradazione dei congeneri a più alta bromurazione e da fenomeni di accumulo di congeneri a bassa bromurazione. I campionamenti di Su et al. (2007) risalgono al periodo antecedente l'abrogazione della miscela Penta-BDE, quindi, risultano essere ricchi dei principali congeneri di questa miscela; i nostri campioni sono stati prelevati nel 2009, periodo in cui l'uso della miscela Penta-BDE era stato ormai notevolmente ridotto e veniva utilizzata, già da qualche anno, la miscela Deca-BDE; ritrovare, quindi, congeneri maggiormente bromurati risulta logico per i nostri campioni. L'alta percentuale del BDE-99 e -154 è giustificata dalla degradazione del BDE-209, di cui sono i principali prodotti di degradazione, mentre un'inaspettato valore così alto di BDE-47 si spiega con il contributo da parte della miscela Penta-BDE, dispersa nell'ambiente negli anni precedenti, ma stoccata nei suoi comparti ambientali dalle basse temperature di queste regioni.

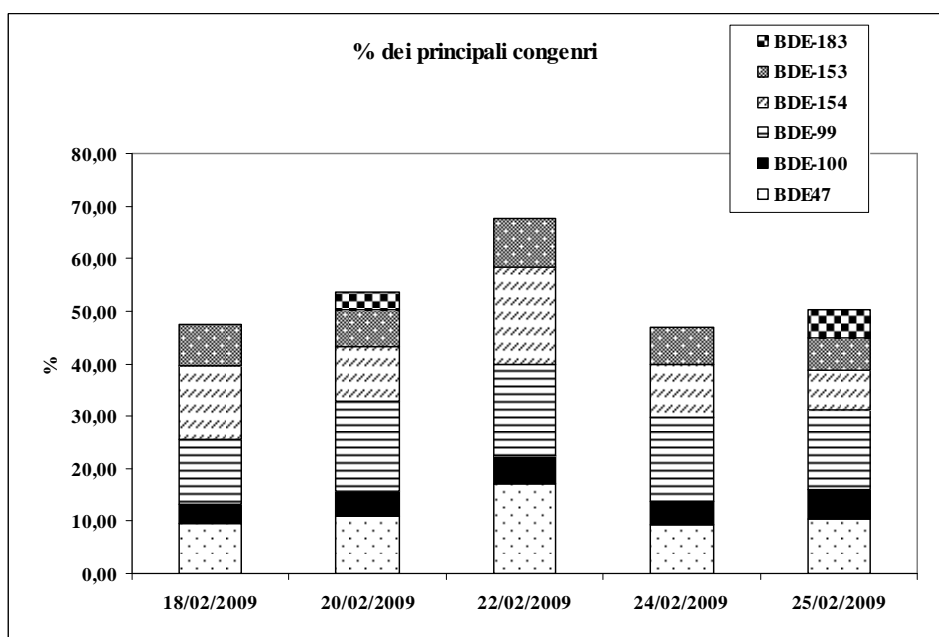


Figura 3.1.8 --Percentuale dei congeneri principali rispetto al totale dei PBDE ritrovati

%	18/02/2009	20/02/2009	22/02/2009	24/02/2009	25/02/2009	Media
BDE47	9,61	10,89	17,01	9,37	10,51	11,48
BDE-100	3,70	4,92	5,50	4,28	5,41	4,76
BDE-99	12,20	17,17	17,28	16,06	15,27	15,60
BDE-154	14,16	10,37	18,64	10,10	7,55	12,16
BDE-153	7,65	6,78	9,12	7,02	6,19	7,35
BDE-183	-	3,39	-	-	5,41	1,76

Tabella 3.1.4 - Percentuale dei principali congeneri rispetto al totale dei PBDE ritrovati

La valutazione del rapporto tra i congeneri principali della miscela Penta-BDE può aiutare a capire la relazione che c'è tra le emissioni di PBDE e il loro trasporto a lungo raggio (LRAT) verso l'Artico. Abbiamo così calcolato i rapporti tra i congeneri BDE-47/99 e BDE-99/100 (vedi tabella 3.1.5), la media di questi rapporti è circa 0,74 e 3,30 rispettivamente. Il grado di degradazione in aria stimata è più alta per il BDE-47 e il BDE-100 rispetto al BDE-99 (*Wania and Dugani, 2003*). Basandosi su queste stime, quando i componenti di una miscela di PBDE viene trasportata da una sorgente alle medie latitudini verso le zone remote dell'Artico, ci aspettiamo che il rapporto BDE-47/99 diminuisca mentre il rapporto BDE-99/100 aumenti. Quindi i bassi valori trovati nei nostri campioni del rapporto BDE-47/99 e i valori del rapporto BDE-99/100 potrebbero essere in parte dati dalla diversa degradazione in aria durante il trasporto, possiamo quindi affermare che parte del contributo alle concentrazioni da noi trovate è dovuto a PBDE provenienti dalle medie e basse latitudini.

Se andiamo a confrontare i rapporti da noi calcolati con quelli presenti in letteratura possiamo vedere come i valori trovati alle medie latitudini siano più elevati per il BDE-47/99 e più bassi per il BDE-99/100. Per il rapporto BDE-47/99, alti valori sono stati registrati in 5 stati americani, questi erano compresi in range tra $1,4 \pm 0,33$ e $2,4 \pm 0,92$ (*Hoh and Hites, 2005*); presso i Grandi Laghi sono stati ritrovati rapporti che variavano tra 1,4 e 2,1 (*Strandberg et al., 2001*); range tra 1,5 e 1,9 in siti rurali nella parte Ovest dell' Europa (*Lee et al., 2004*).

Per il rapporto BDE 99/100 in cinque stati americani sono stati ritrovati valori che vanno da $4,1 \pm 0,44$ a $5,1 \pm 0,63$ in cinque stati degli USA (*Hoh and Hites, 2005*); valori di 3,6 e 3,8 per siti rurali europei (*Lee et al., 2004*); da 6,6 a 8,0 per i Grandi Laghi (*Strandberg et al., 2001*) e valori di circa 5,7 a Chilton, Ovest Europa (*Lee et al., 2004*). Confrontando questi dati con i nostri vediamo che il rapporto BDE-99/100 risulta essere inaspettatamente più basso. Ricordando comunque che le concentrazioni del BDE-47, 99 e 100 possono essere influenzate dalla degradazione dei congeneri più bromurati (*Eriksson et al., 2004; Soderstrom et al., 2004*), perciò, questi rapporti possono essere influenzati da questi processi competitivi; il rapporto BDE-99/100 così basso può quindi essere dovuto a una degradazione del BDE-209 al BDE-100. Questi rapporti difficilmente riescono a spiegare esaurientemente la relazione tra sorgenti e trasporto a lungo raggio, molti fattori esterni possono incidere in maniera rilevante, comunque

sia rimangono un utile strumento per capire quali sorgenti influenzino maggiormente un sito di campionamento.

Ratio	18/02/2009	20/02/2009	22/02/2009	24/02/2009	25/02/2009	Media
BDE-47/99	0,79	0,63	0,98	0,58	0,69	0,74
BDE-99/100	3,30	3,49	3,14	3,75	2,83	3,30

Tabella 3.1.5 – Rapporti BDE-47/99 e BDE-99/100

Neve

In figura 3.1.9 sono riportate le concentrazioni della somma totale dei PBDE determinate nella fase particolato e nella fase disciolta dei campioni di neve. I valori variano tra 129,75 e 1115,56 pg/L nella fase particolato e tra 135,47 e 768,97 pg/L nella fase disciolta. In letteratura non sono presenti dati di PBDE relativi a campioni di neve artici, quindi, non possiamo fare confronti con altre concentrazioni.

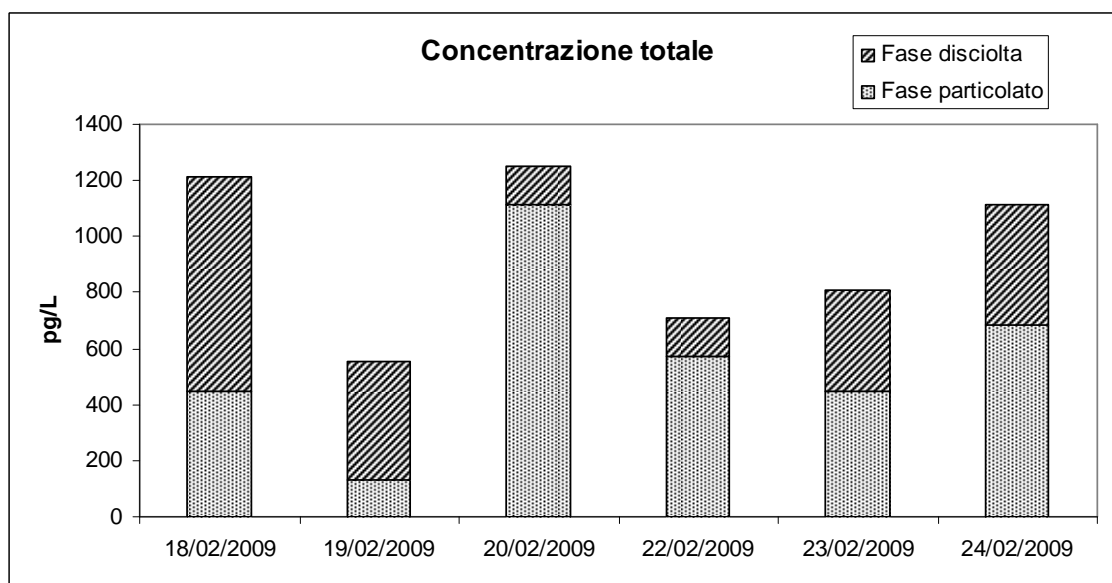


Figura 3.1.9 - Concentrazione totale dei PBDE nella fase disciolta e particolato

Come si può notare dai dati mostrati in figura le concentrazioni sono, in generale, decisamente più elevate nella fase particolato rispetto a quella disciolta; tale risultato è in pieno accordo con

le proprietà chimico-fisiche di questa classe di composti. Nei primi due campioni la fase disciolta risulta più elevata rispetto alla fase particolato perché a questi due campioni manca il contributo del residuo particolato rimasto sul fondo del contenitore della filtrazione, il recupero del residuo è stato effettuato per tutti i campioni tranne che per i primi due.

Il campionamento è avvenuto in un periodo molto breve, circa 10 giorni, durante il quale sono avvenuti repentini cambi di condizioni meteorologiche, ciò ha influenzato maniera rilevante i nostri dati. I risultati che abbiamo ottenuto ci possono dare, così, un'idea sulla presenza dei PBDE nelle regioni artiche ma è difficile poter ottenere un andamento o un confronto utile tra le varie matrici e fasi.

In figura 3.1.10 possiamo vedere la somma totale della miscela Penta-BDE nei nostri campioni, presenti nella fase disciolta e particolata a confronto.

I campioni prelevati durante le prime due giornate di campionamento (18 e 19 febbraio), presentano livelli di concentrazioni molto più alte nella fase disciolta rispetto a quella particolato, mentre nei giorni successivi (20 e 22 febbraio) si ha un andamento opposto. Questa differenza di valori tra giorni così vicini è dovuto agli eventi meteorologici che sono avvenuti: il primo periodo è stato infatti caratterizzato da temperature più elevate, con una media di circa -5°C, mentre nei giorni successivi si sono verificati episodi di forte maltempo, bufere, e drastico calo delle temperature, intorno a -13°C, condizioni meteorologiche più usuali per tale periodo. La neve campionata il 18 e 19 febbraio era molto densa, spesso ghiacciata, in particolar modo lo strato più superficiale, infatti anche la resa come volume di neve disciolta è stata superiore; questo strato di ghiaccio superficiale è il risultato di scioglimenti diurni e congelamenti notturni continui, dovuti alle elevate temperature presenti durante le ore diurne e il drastico calo nelle ore notturne. Il periodo centrale del campionamento è stato caratterizzato da turbolenze, anche molto violente, la neve campionata era molto soffice, e la resa in litri è stata più scarsa. Poiché i PBDE si spostano su lunghe distanze adsorbiti su aerosol, i venti di questi giorni hanno portato nuovi PBDE su fase particolato, non stupisce, quindi, che i valori per la miscela Penta-BDE in siano maggiori in questa fase rispetto a quella disciolta.

Queste variazioni così estreme del tempo e delle temperature non ci danno la giusta distribuzione degli inquinanti tra le due fasi, gli equilibri di ripartizione hanno subito variazioni in periodi molto brevi e gli andamenti che vediamo non sono rappresentativi.

Le ultime due giornate di campionamento sono state caratterizzate da condizioni meteo classiche per il mese di febbraio alle Isole Svalbard: temperature fredde intorno a -13° con venti moderati e cielo sereno. La ripartizione tra la fase disciolta e particolato che osserviamo si avvicina, probabilmente, di più alle reali condizioni della distribuzione tra le due fasi e della presenza dei PBDE in Artico.

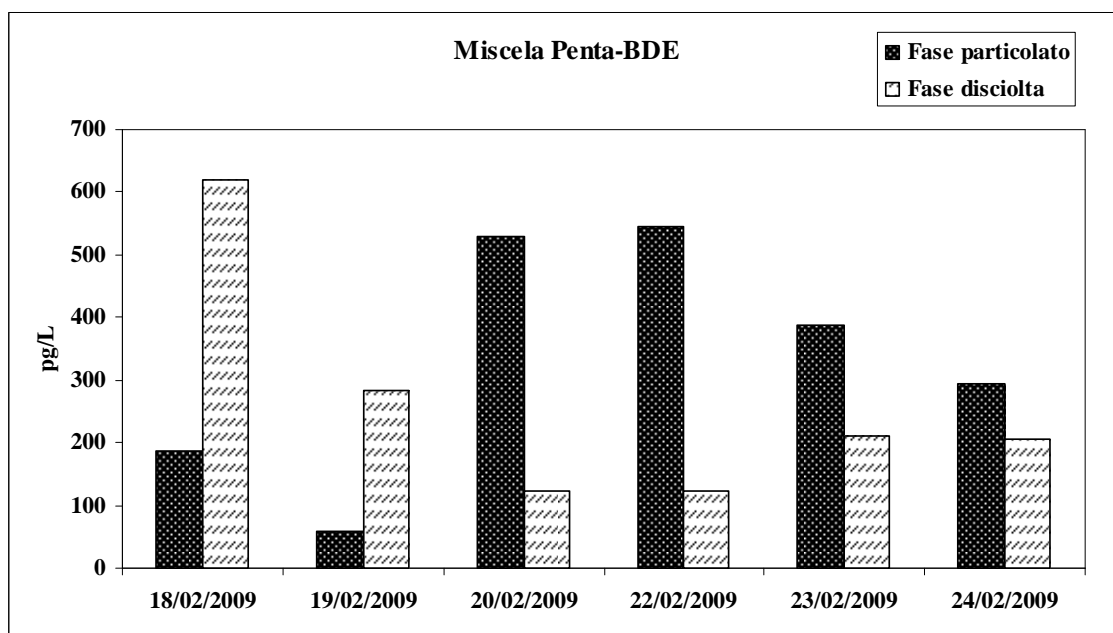


Figura 3.1.10 - Concentrazione totale dei PBDE nella fase disciolta

I composti predominanti nei campioni analizzati sono risultati essere BDE-28, -47, -99 e -100 ovvero i principali costituenti della miscela Penta-BDE, le concentrazioni relativamente abbondanti di questi composti riflette il largo utilizzo che ne è stato fatto fino al 2004, anno in cui è stata bandita dal mercato. Le misure restrittive adottate per questi prodotti sono molto recenti e le fonti di rilascio ambientali sono tutt'oggi presenti, molti oggetti di uso comune continueranno ancora per molti anni ad essere una sorgente attiva di questi composti; altra sorgente molto importante per questi composti sono i congeneri a più alto grado di bromurazione fotolabili e termicamente instabili. La miscela Octa-BDE è stata ritrovata solo in alcuni campioni e a concentrazioni molto basse, probabilmente dovuto al suo impiego più limitato.

3.2 - Presenza di PBDE in Antartide: studio di matrici biota (Foca di Weddell)

In virtù delle loro proprietà che li rendono inquinanti persistenti e ubiquitari, i PBDE sono presenti in regioni distanti dalle loro sorgenti di emissione e i dati di monitoraggio ambientale confermano fenomeni di trasporto ambientale a lungo raggio. Recenti studi hanno investigato sulla presenza di PBDE in matrici ambientali antartiche, come neve, aria e acqua di mare, rarissimi invece sono le ricerche condotte sui PBDE in campioni di biota; i pochi articoli che parlano di bioaccumulo riguardano principalmente campioni di krill (*Euphasia superba*), l'organismo protagonista della catena trofica antartica (vedi figura 3.2.1).

L'Antartide, a causa del suo isolamento geografico e delle condizioni meteorologiche estreme è considerata la zona incontaminata per eccellenza, per cui la determinazione di concentrazioni di questi inquinanti risulta un importante indicatore per la comprensione del reale grado di contaminazione globale. Questo continente, vista l'abbondanza di fattori che controllano l'ecosistema e che garantiscono l'abbondanza di sostanze nutrienti, presenta una delle più variegata catene trofiche di tutto il globo.

3.2.1 - La catena trofica antartica

L'accumulo di lipidi come fonte di energia rende la catena trofica antartica vulnerabile al bioaccumulo; in particolare i livelli superiori della catena trofica sono particolarmente esposti a tale rischio. Si ritiene, inoltre, che i mammiferi marini siano particolarmente sensibili all'esposizione ai contaminanti a causa del loro utilizzo della componente grassa per espletare alcune funzioni che richiedono un grande dispendio energetico come, ad esempio, la muta, lo svezzamento e l'allattamento, poiché durante queste fasi il consumo di cibo è molto basso.

Per quanto riguarda gli organismi marini, si differenziano due comunità, quella pelagica, rappresentata da organismi che nuotano o vengono trasportati dalle correnti marine, e quella bentonica, che vive sui fondali. Gli scambi tra di esse sono continui e possono avvenire in modo diretto o indiretto, attraverso la materia organica sospesa nella colonna d'acqua.

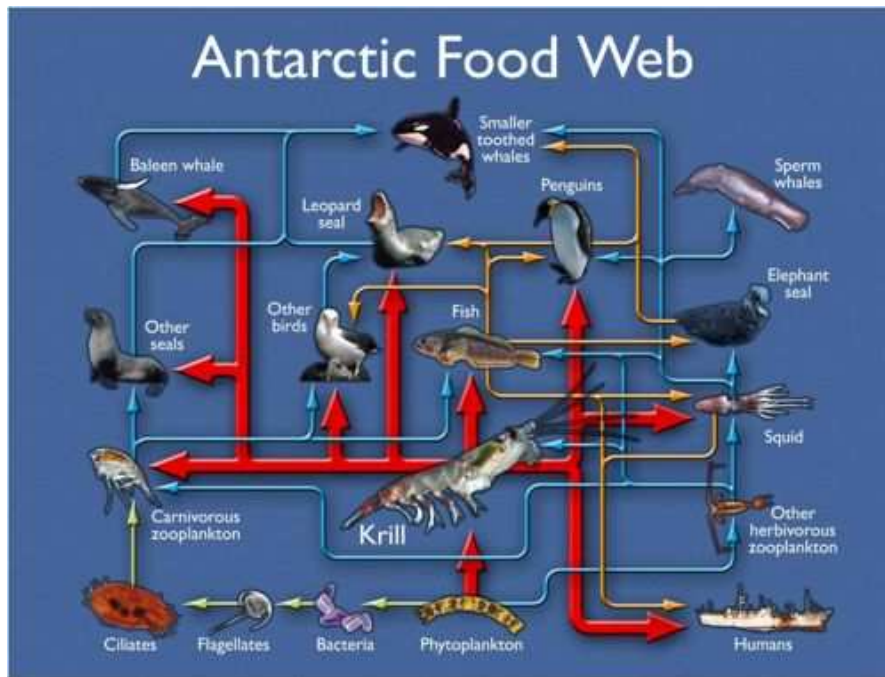


Figura 3.2.1 - Schema della catena trofica marina antartica

Nella zona pelagica, in particolare, i fronti e la copertura stagionale del ghiaccio influenzano gli ecosistemi e le comunità presenti. Si distinguono tre zone pelagiche principali:

- ◆ zona libera dai ghiacci, ricca di nutrienti, ma povera di produzione primaria. Vi si ritrovano copepodi (piccoli crostacei), salpe e piccoli eufasiacei (simili a piccoli gamberetti, con dimensioni non superiori ai 2 cm). Si ritrovano anche calamari e pesci bentonici.
- ◆ zona stagionalmente coperta dal ghiaccio marino, coperta in inverno e primavera, ma non in estate ed autunno dal ghiaccio. Nei periodi in cui risulta scoperta avvengono grandi fioriture di fitoplankton, che portano un'elevata produttività primaria (definita come la velocità alla quale l'energia solare viene trasformata dalla fotosintesi clorofilliana in sostanza organica). Si ritrovano salpe, copepodi, eufasiacei, larve di pesci e soprattutto krill (*Euphasia superba*), che rappresenta l'elemento fondamentale della dieta di balene, foche e pinguini.
- ◆ zona permanentemente coperta dal ghiaccio, che comprende le acque fredde vicino alla costa e in particolare ampie zone nei mari di Weddell e Ross. La produttività primaria è intensa, ma limitata ad un breve periodo di tempo. Si ritrova l'*Euphasia crystallophias*, che costituisce l'elemento principale della dieta di pesci pelagici, tra cui il *Pleurogramma antarcticum*. Le alghe si depongono quasi interamente sui fondali, dando origine ad una ricca fauna bentonica, che rappresenta una risorsa alimentare per numerosi crostacei e pesci, a loro volta predati da pinguini e foche (Bargagli, 2008).

In generale, gli organismi pelagici sono caratterizzati da bassi livelli di produzione, lunga durata della vita ed elevate dimensioni corporee e biomassa.

Il fitoplankton antartico presenta una numerosa serie di specie unicellulari ma, solitamente, nei pressi delle coste si ha la presenza di una sola specie opportunistica, rappresentata da *Thalassiosira tumida* nel Mare di Weddell e *Phaeocystis* nel Mare di Ross. La crescita del fitoplankton subisce una notevole variazione in base alla stagione: durante la primavera si ha un rapido aumento della biomassa, con i massimi livelli di attività primaria che vengono raggiunti nei mesi di Dicembre e Gennaio, per diminuire nuovamente a Febbraio (Smith et al., 2000).

Lo zooplancton comprende circa 70 gruppi di organismi, tra i quali prevalgono, nella zona delle acque libere, i copepodi. Nei pressi della banchisa, invece, prevalgono gli eufasiacei, in particolare l'*Euphasia superba*. Il ciclo biologico di questi organismi, legato alle correnti marine, prevede la deposizione delle uova ad una profondità di circa 100 metri ed un successivo movimento di queste ultime, fino ad una profondità di circa 2000 metri, grazie al trasporto delle acque di fondo. Le uova poi si schiudono in primavera e le larve risalgono in superficie in estate. Questi organismi vivono solitamente in "sciami", differenziati per dimensioni ed età e si trovano vicino alla superficie, tra i 20 e i 50 metri di profondità, nel periodo diurno, mentre nel periodo notturno scendono fino a 200 metri di profondità.

La specie *Euphasia superba* è al centro della catena trofica (vedi figura 3.2.1) e canalizza la sostanza organica dal fitoplankton ai grandi invertebrati. I calamari e altre specie di cefalopodi sono grandi consumatori di krill e, a loro volta, sono predati da balene, albatros, pinguini e foche. Anche i pesci, che nell'Oceano Meridionale rappresentano soltanto l'1% delle specie presenti sul pianeta, sono grandi consumatori di krill. Le specie più abbondanti sono quelle che appartengono al sottordine dei Notothenoidei, ai quali appartiene il *Pleurogramma antarcticum*, organismo pelagico che costituisce la preda per molti grandi carnivori antartici.

In Antartide sono inoltre presenti 43 specie di uccelli (pinguini e procellarie in gran parte), 12 delle quali si riproducono sul continente e, dopo la stagione riproduttiva, migrano verso nord. Gli uccelli si alimentano in genere di krill e larve di pesci. Per quanto riguarda i pesci bentonici, si ritrovano soprattutto specie che appartengono al genere *Trematomus*, che abitano a profondità diverse, la cui dieta varia con la disponibilità delle prede, che possono essere policheti, anfipodi, molluschi, crostacei, piccoli pesci o uova di pesci. Infine, i mammiferi marini che si ritrovano nelle acque dell'Oceano Meridionale, si nutrono soprattutto di krill.

3.2.2 - La foca di Weddell

Le foche Antartiche appartengono a due principali famiglie: i focidi e gli otaridi. La prima comprende le cosiddette "vere" foche, cioè quelle prive di padiglione auricolare esterno, anche

se provviste di udito ben sviluppato. Fanno parte di questa specie in particolare: la foca di Weddell, la foca di Ross, la foca cancrivora, la foca leopardo e l'elefante marino. La seconda famiglia include due specie di otarie, ben riconoscibili per il piccolo padiglione auricolare: l'arctocefalo antartico e l'arctocefalo delle Kerguelen, detti anche foche da pelliccia o lupi di mare.

La foca di Weddell (*Leptonychotes weddellii*) (figura 3.2.2) si trova principalmente nelle coste antartiche ma colonie minori sono presenti nella Georgia del Sud, sulle isole Sandwich meridionali, sulle isole Shetland meridionali e sulle Isole Orcadi Meridionali.



Figura 3.2.2 - Esemplare di foca di Weddell (*Leptonychotes weddellii*)

Conseguentemente all'aumento della disponibilità di krill, che rappresenta una fonte di nutrimento molto importante per questi animali, oggi la popolazione di questa specie di foche (nel 2000, è stata stimata intorno a circa 800.000 esemplari) è cresciuta in modo molto rapido, a tal punto che alcune zone hanno presentato problemi di sovraffollamento.

Queste specie sono protette, oltre che dalla legislazione specifica di ciascuna delle isole in cui abitano, dalla Convenzione per la Conservazione delle foche dell'Antartide (Convention for the Conservation of Antarctic Seals, CCAS e dal Trattato Antartico.

La foca di Weddell ha un pelo di colore grigio acciaio con macchie biancastre o giallognole diffuse su tutto il corpo, questi colori nella stagione estiva tendono a schiarirsi mentre in inverno si scuriscono; gli individui giovani non presentano macchie. I maschi adulti misurano tra i 250 e i 290 cm di lunghezza mentre le femmine possono raggiungere i 330 cm; il peso è compreso fra i 400 e i 600 kg. Gli individui di sesso maschile possono vivere al massimo 15 anni, mentre la vita delle femmine risulta più lunga e può arrivare fino a un massimo 23 anni (<http://MarineBio.org>, 2009; Nowak et al., 1983).

L'habitat naturale di questi animali sono i ghiacci lungo le coste dell'intero continente e di diverse isole antartiche, infatti non migrano e i loro spostamenti sono, per lo più, dovuti all'adattamento alle variazioni delle condizioni dei ghiacci e alla ricerca di cibo. Si immergono

nelle spaccature del ghiaccio per procacciarsi cibo e riemergono operando dei buchi con i denti superiori dove il ghiaccio è meno spesso.

La stagione riproduttiva è concentrata tra Novembre e Gennaio; i maschi arrivano prima per competere, spesso con battaglie, per il territorio riproduttivo, che di solito contiene circa 10 femmine. I cuccioli nascono, in genere, tra Settembre e Novembre, il parto avviene sulla spiaggia e le femmine ritornano in calore poco dopo aver partorito. I cuccioli e gli esemplari giovani sono cacciati dalle foche leopardo e dalle orche assassine (*Edwards H., 2000*).

L'allattamento dei piccoli dura per un breve periodo che, di solito, corrisponde alla breve estate antartica (circa 4 mesi), i cuccioli, infatti, imparano presto a pescare da soli (*Goldsworthy et al., 1999;; King, 1983*). L'alto contenuto lipidico del latte di queste specie (circa il 40%) è ritenuto uno dei motivi che facilitano il trasferimento di risorse energetiche tra la madre e il cucciolo (*Oftedal et al., 1987*); questo aspetto diventa particolarmente rilevante nei primi 100 giorni di allattamento quando si osserva una diminuzione del contenuto acquoso del latte e un aumento di quello lipidico e proteico. Contrariamente a quanto accade per altre specie di foche Antartiche, le femmine si nutrono regolarmente nel periodo dell'allattamento, visto che la richiesta energetica dei cuccioli aumenta velocemente mentre questi crescono. Le prede delle foche antartiche nel periodo di allattamento sono, prevalentemente, gli sciame di krill (*Euphasia Superba*), seguiti da pesci e calamari. Anche le specie di pesci di cui si nutrono le foche sono, in generale, quelle che si nutrono di krill (*Danieri et al., 1999*).

3.3.3 - Campionamento e trattamento dei campioni

Questo studio, parte del progetto 9.1 "Micropollutants and Microchemicals in the Environment: Cycling and Relationships with Climate Change" patrocinato dal Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA), ha avuto come oggetto l'analisi di campioni da due esemplari di foca di Weddell (*Leptonychotes weddellii*) rinvenuti morti all'interno della Specially Protected Area No. 161 (ASPA No. 161) situata nel Mare di Ross (Antartide) durante la XX spedizione italiana in Antartide del 2004 – 2005. .

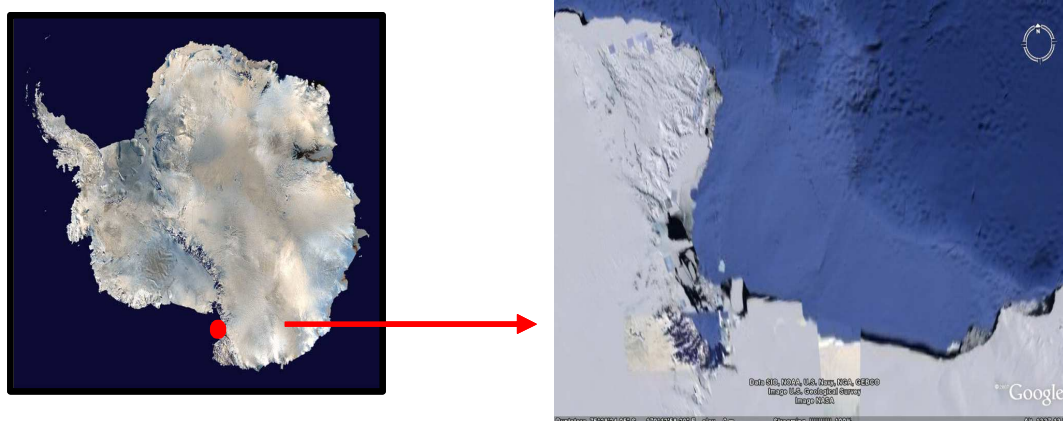


Figura 3.2.3 - Baia Terranova, Mare di Ross

Dopo essere stati raccolti, entrambi gli esemplari sono stati conservati a -20°C e trasportati in Italia, dove sono stati dissezionati e consegnati a diversi laboratori di ricerca. La presente ricerca ha riguardato, in particolare, l'analisi di parte di alcuni organi, elencati nella tabella 3.2.1.

Nome campione	Peso (g) $\pm 0,0001$ g
RENE 1	4,2180
CUORE 1	4,2559
INTESTINO 1	4,8503
FEGATO 1	4,0073
MILZA 1	4,1900
POLMONE 1	4,3538
PLACENTA 1	4,1807
RENE 2	4,2048
CUORE 2	4,5742
INTESTINO 2	4,4543
FEGATO 2	4,4674
MILZA 2	4,5970
POLMONE 2	4,2558

Tabella 3.2.1 - Organi analizzati per ogni esemplare di foca



Figura 3.3.4 – Il campione Placenta 1 viene dissezionato e preparato per l'analisi.

I campioni sono stati estratti con il metodo proposto da Kannan et al. (1998) .

I campioni freschi, precedentemente pesati, sono stati tagliati grossolanamente con un bisturi e, successivamente, macerati finemente con un pestello insieme a circa 100 g di Na_2SO_4 anidro per favorirne la disidratazione (figura 3.2.5).



Figura 3.2.5 – Trasferimento del campione e sua omogeneizzazione in mortaio

I campioni sono stati, dunque, alloggiati in un ditale in vetro ed estratti in soxhlet per 12 ore con una miscela 3:1 Diclorometano/n-Esano (300 mL Diclorometano Pestanal, 100 mL n-Esano Pestanal).

Gli estratti sono stati, dunque, concentrati fino ad un volume di circa 10 mL con rotavapor (Büchi, Switzerland) e fino ad un volume finale di 9 mL sotto leggero flusso di azoto.

I campioni sono stati, successivamente, filtrati su filtri in PTFE da 0,45 µm. Qualora la filtrazione risultasse difficile si è proceduto ad un lavaggio acido degli estratti con acido solforico concentrato in ugual volume rispetto al campione, i campioni trattati con acido sono stati lasciati riposare una notte per ottenere una perfetta separazione di fase. E' stata, dunque, recuperata la fase superiore, riportata ad un volume di 9 mL e sottoposta, nuovamente, alla procedura di filtrazione. I campioni che hanno presentato la necessità di subire il trattamento acido sono stati: Rene 1, Intestino 1, Placenta 1, Rene 2, Polmone 2.

Gli estratti sono stati sottoposti ad una procedura di purificazione mediante il sistema Power-Prep™ (Fluid Management Systems Inc.) secondo il metodo descritto da Pirard et al. (2002). Questo sistema di purificazione automatizzato si basa sull'utilizzo in sequenza di colonne preimpaccate di silice, allumina e carbone (PX-21); l'intero sistema è controllato dal software DMS 6000. Durante la procedura di purificazione automatizzata vengono raccolte due frazioni: la prima (F1) contiene PCB orto sostituiti, pesticidi clorurati e PBDE; la seconda frazione (F2) contiene PCDD/F e PCB non-orto sostituiti. Gli estratti sono stati fatti passare attraverso colonne multistrato di silice e di allumina con 80 mL di esano ad un flusso di 5 mL/min. Le interferenze sono state eliminate con 60 mL di diclorometano (DCM) al 5% in esano a 12 mL/min. Per quanto riguarda i composti da noi cercati, ovvero i PBDE, questi sono stati eluiti dalla colonna di silice con 140 mL di DCM al 5% in esano (F1). Le due frazioni raccolte dal Power-Prep™ sono state concentrate fino ad un volume finale di 1 mL per la successiva analisi gascromatografica.

Per valutare le percentuali di recovery, prima dell'inizio dell'estrazione, i campioni sono stati addizionati di una miscela di standard contenente i PCB 30 e 209 (Supelco Inc.). Analizzando le percentuali di recovery, si osserva che, generalmente, esse risultano superiori al 90 %; queste elevate percentuali evidenziano recuperi pressoché quantitativi, mostrando come il metodo di estrazione e analisi scelto sia adeguato per la determinazione dei composti ricercati.

3.3.4 - Risultati

Prima di passare alla discussione dei risultati va fatta innanzitutto una premessa: questi sono dati preliminari, infatti, sono in corso ancora le analisi per BDE-209, lo studio del contenuto lipidico e le varie classi lipidiche presenti, lo studio delle caratteristiche fisiche, fisiologiche e morfologiche degli esemplari raccolti. In questo capitolo riporto quello che abbiamo ottenuto dalle sole analisi condotte nei nostri laboratori chimici.

La sola presenza dei PBDE nei due campioni di foca di Weddell costituisce di per sé un importante risultato; questi valori ci confermano, oltre alle capacità di bioaccumulo di questi composti, la loro introduzione nella catena trofica antartica. Nel primo grafico 3.2.6 ho riportato la somma dei congeneri presenti in tutti gli organi per ogni foca, i due esemplari presentano una concentrazione totale di PBDE di 36,47 e 30,73 pg/g p.f.

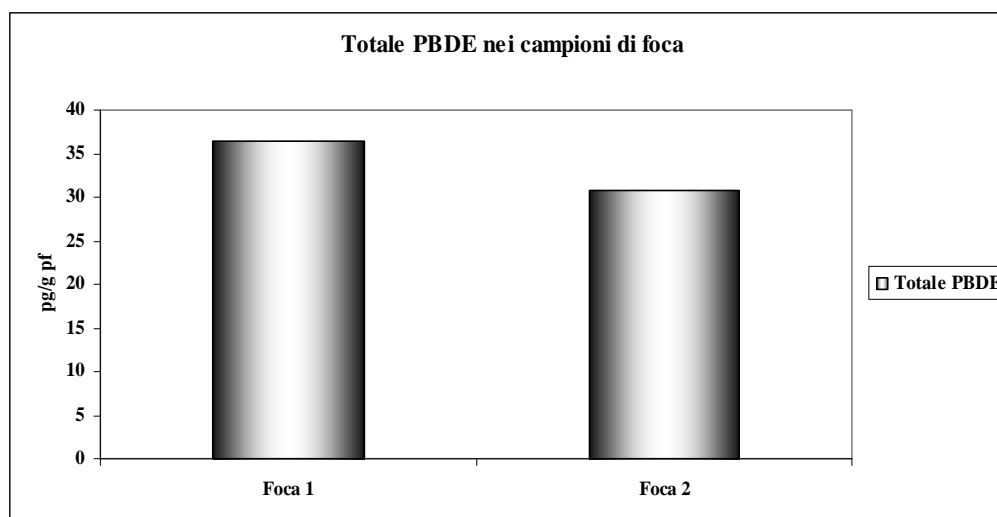


Figura 3.2.6 – Concentrazioni totali di PBDE nei due esemplari di foca

Nel grafico 3.2.7 si può vedere l'accumulo di PBDE nei vari organi analizzati, per entrambi gli esemplari i polmoni presentano concentrazioni maggiori; da notare, inoltre, la presenza preponderante di questi inquinanti ritrovati nella placenta.

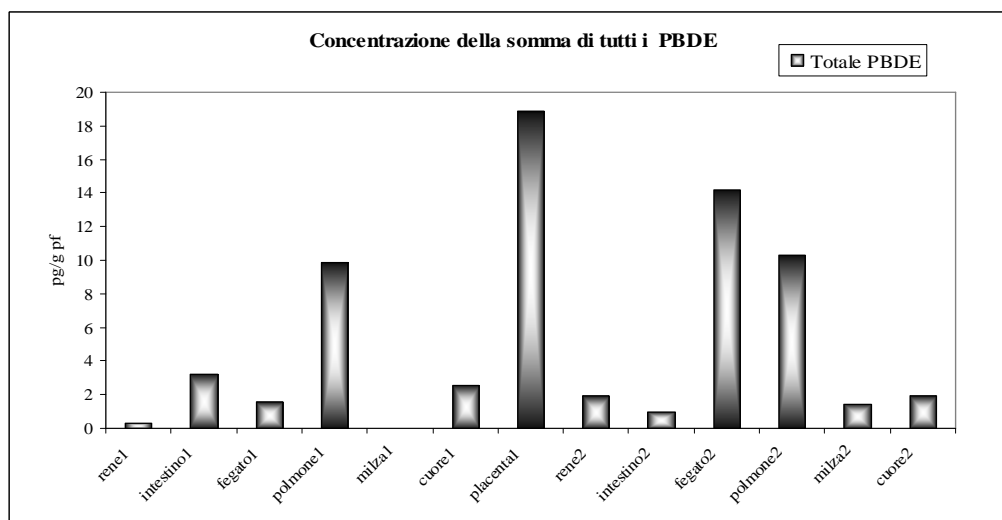


Figura 3.2.7 – Concentrazioni totali di PBDE nei vari organi

Per comprendere i meccanismi della biomagnificazione di questi composti siamo andati a confrontare i nostri risultati con quelli in letteratura relativi alle concentrazioni di PBDE nel krill, poiché questo costituisce una delle principali fonti di alimentazione per le foche antartiche. Nel grafico 3.2.8 sono riportati i livelli delle concentrazioni dei congeneri principali ritrovati nei nostri campioni; in entrambe le foche, il PBDE più abbondante è risultato essere il BDE-154, un componente della miscela Penta-BDE.

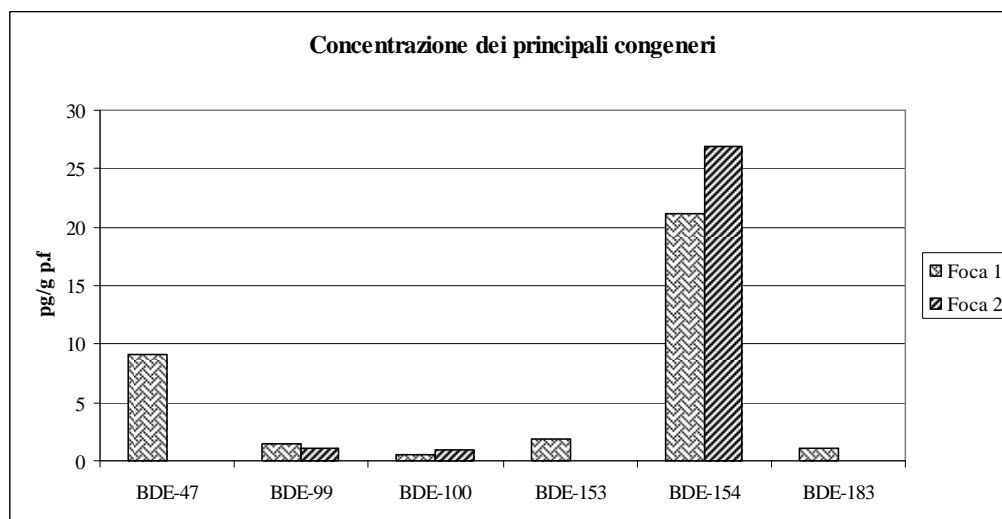


Figura 3.2.8 – Concentrazioni dei principali congeneri

Durante successive ricerche, nei nostri laboratori sono state condotte analisi su campioni di krill prelevati durante la campagna oceanografica 2005-2006, nell'ambito del progetto del PNRA.

I valori di concentrazione determinati per i PBDE variano tra 98,69 pg/g p.f. e 277,10 pg/g p.f. . La distribuzione media dei singoli congeneri è riportata in figura 3.2.9; dai dati riportati i congeneri più abbondanti risultavano essere BDE 154 > BDE153 > BDE 99 > BDE47, ovvero i principali costituenti della miscela Penta-BDE.

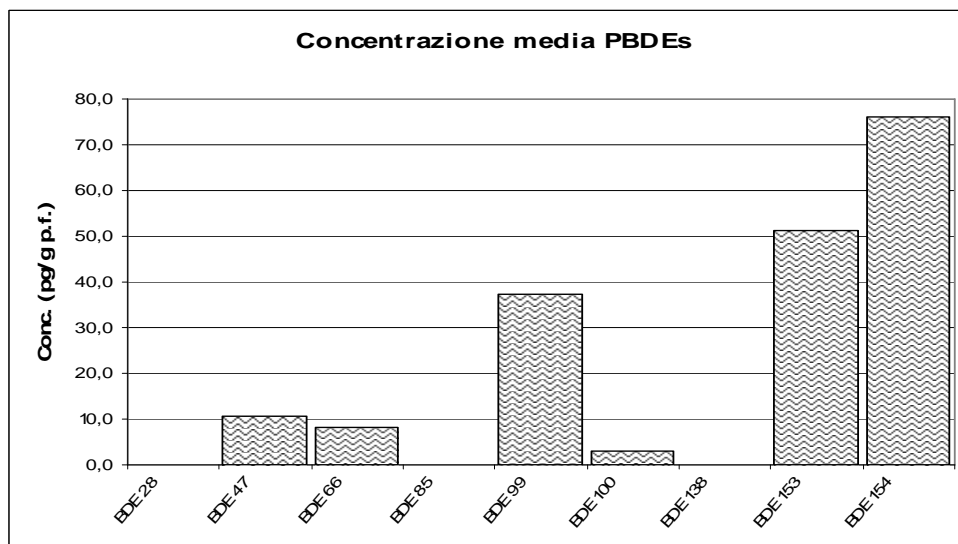


Figura 3.2.9 - Concentrazioni dei principali congeneri

Sia nei campioni di foca che di krill, di cui la foca di Weddell si ciba, abbiamo trovato lo stesso congenero come PBDE più abbondante, ovvero il BDE-154, questo fatto conferma, in parte, la capacità di biomagnificare di questi composti all'interno della catena trofica antartica.

Il fatto che il congenero più abbondanti sia il BDE-154 potrebbe essere legato ad un'immissione recente del BDE-209 in queste regioni polari, il quale, mediante processi di degradazione, potrebbe portare alla formazione di congeneri a minor grado di bromurazione come il BDE-154. Nei campioni di krill analizzati nei nostri laboratori i valori relativi ai principali congeneri, sono inferiori a quelli ritrovati nelle foche, in accordo con i dati di letteratura (vedi tabella 3.2.2). Per quanto riguarda il BDE-154, i livelli delle concentrazioni sono molto diversi per le due specie: nell' *Euphasia superba* prelevata nella campagna oceanografica del 2006 si ha una media di 76,8 pg/g p.f., mentre nelle foche si hanno valori di 21,1 e 26,9 pg/g p.f. I livelli più elevati di PBDE nel krill potrebbero essere dovuti ad una maggiore capacità di assorbimento di questa specie per tali composti, infatti, essendo un organismo di piccole dimensioni risente maggiormente dei cambiamenti chimico-fisici dell'ambiente in cui vive.

Area	Mare di Ross	Antarctic Peninsula		Australian side
Bibliografia	Corsolini et al., 2006	Ciuchiolo et al., 2004		Nash et al., 2008
Anno	2000	2001-2002		2006
	ng/g p.f.	ng/g lipid		pg/g p.f.
BDE 28	0,05	-	-	10,2
BDE 47	0,15	568a	2,00b	348
BDE 66	-	-	-	27,5
BDE 85	-	-	-	88,9
BDE 99	0,02	622a	2,50b	675
BDE 100	-	128a	0,50b	118
BDE 138	-	-	-	45,5
BDE 153	-	-	-	223
BDE 154	-	-	-	108

a – Krill giovane; b - Krill adulto

Tabella 3.2.2 - Concentrazioni di PBDE in campioni di Krill

BIBLIOGRAFIA

- * Agrell C., Ter Schure A.F.H., Svedere J., Bokenstrand A., Larsson P., Zegers B.N., (2004). *PBDEs at a solid waste incineration plant I: atmospheric concentration*. Atmospheric Environment 38, 5139-5148
- * Alaei M., Arias P., Sjobin A., Bergman A., 2003. *An overview of commercially used brominated flame retardants, their application, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release*. Environment International 29, 683-689.
- * Allsopp M., Santilli D., Johnson P., Stringer R., 1999. *The tip of the iceberg. State of knowledge on persistent organic pollutants in Europe and the Arctic*. Primavera, Amsterdam.
- * AMAP, (2004) "AMAP Assessment 2002 Persistent Organic Pollutants in the Arctic" Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway.
- * AMAP (2000) – AMAP Assessment Report "Arctic Pollution Issues – Arctic Monitoring and Assessment Programme" Oslo, Norway
- * AMAP (2002) - Arctic Monitoring and Assessment Programme " Persistent organic pollutants in the Arctic" www.amap.no
- * AMAP (2005) - Arctic Monitoring and Assessment Programme and Arctic Council Action Plan to Eliminate Pollution of the Arctic (ACAP) "Fact Sheet. Brominated Flame Retardants in the Arctic"
- * Amiard, J.C., Amiard – Triquet, C., Berthet, B. & Metayer, C. (1987). Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 106, 73-89.
- * Anderson O. and Blomqvist G., 1981, *Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden*, Chemosphere 10, pp. 1051-1060.

- * Arlas P.A., 2001. Proc. 2nd Int. Workshop Brominated Flame Retardants, Stockholm, Sweden,17-19.
- * ATSDR, 2004. *Toxicological Profile for Polybrominated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers (Update)*. US Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registries.
- * Bargagli R. (2005) “Antarctic Ecosystems. Environmental contamination, climate change, and human impact” Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- * Barrie L.A., Gregor D., Hargrave B., Lake R., Miur D., Shearer R., Tracey B., Bidleman T. (1992) “Arctic contaminants: sources, occurrence and pathways” the Science of the Total Environment, 122, 1-74.
- * Bayen S., Thomas G.O., Lee H. K., Obbard J.P., 2003. Occurrence of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in green mussels (*Perna viridis*) from Singapore, southeast Asia. Environ. Toxicol. Chem. 22, 2432-2437.
- * Bergerard, J. 1989. Ecologie des laisses de marée. Année Biologique 28, 39-54.
- * Birnbaum L.S., Staskal D.F., 2004, *Brominated flame retardant cause for concern?*, Environmental Health Perspectives 112, 9-17.
- * Rossana Bossi, Henrik Skov, Katrin Vorkamp, Jesper Christensen, Suresh C. Rastogi, Axel Egeløv, Dorthe Petersen . Atmospheric concentrations of organochlorine pesticides, polybrominated diphenyl ethers and polychloronaphthalenes in Nuuk, South-West Greenland (2008)
- * Brown, A.C. & McLachlan, A. (2006). Ecology of Sandy Shores. Elsevier, Amsterdam.
- * BSEF 2005, Bromine Science and Environmental Forum Low Levels Of PBDEs Found In Pacific Northwest Population Well Below Potential Levels Of Concern To Human Health Or Environment
- * Castano P. et al., 1999, *Anatomia Umana: per le facoltà di farmacia e di scienze e per le scuole biomediche dirette ai fini speciali*, edi-ermes, Milano.

- * Calosi, P., Morritt, D., Chelazzi, G. & Ugolini, A. (2007). Physiological capacity and environmental tolerance in two sandhoppers species with contrasting geographical ranges: *Talitrus saltator* and *Talorchestia ugolinii*. *Marine Biology* 151, 1647-1655.
- * Cetin B., Odabasi M., 2007, *Air-water exchange and dry deposition of polybrominated diphenyl ethers at a coastal site in Izmir Bay, Turkey*, *Environ Sci Technol*, 41(3): 785-791.
- * Cetin B., Odabasi M., 2008. Atmospheric concentrations and phase partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Izmir, Turkey. *Chemosphere* 71, 1067-1078.
- * Chelazzi, G. & Vannini, M. (1988). Behavioural adaptations to intertidal life. ASI Series 151, Plenum Press, New York..
- * Chen L.G., Bi-Xian M., Bi X.H., Chen S.J., Wang X.M., Ran Y., Luo X.J., Sheng G.Y., Fu J.M, Zeng E.Y., 2006. Concentration levels, compositional profiles, and gas-particle partitioning of polybrominated diphenyl ethers in the atmosphere of an urban city in South China. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1190-1196.
- * Chen G., and Bunce N.J., (2003). Polybrominated Diphenyl Ethers as Ah Receptor Agonists and Antagonists *Toxicological Sciences* 76, 310–320.
- * Cincinelli A., Del Bubba M., Martellini T., Gambaro A., Lepri L., 2007. *Gas-particle concentration and distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Prato (Italy)*. *Chemosphere* 68(3), 472-478.
- * Cincinelli A., Mandorlo S., Dickhut R.M., Lepri L., 2003. Particulate organic compounds in the atmosphere surrounding an industrialized area of Prato (Italy). *Atmospheric Environment* 37, 3125-3133.
- * Ciuchiolo A., Dickhut R., Cochran M., Ducklow H. Persistent Organic Pollutants at the Base of the Antarctic Marine Food Web. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 3551-3557
- * Corsolini S., Ademollo N., Teresa Romeo T., Greco S., Focardi S. (2005). Persistent organic pollutants in edible fish: a human and environmental health problem *Microchemical* 79, 115– 123.

- * Corsolini S. (2008), “Industrial Contaminants in Antarctic Biota” *Journal of Chromatography A*
- * Corsolini S., Covaci A., Ademollo N., Focardi S., Schepens P., 2006. Occurrence of organochlorine pesticides (OPCs) and their enantiomeric signatures, and concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the Adelie penguin food web, Antarctica.
- * Danieri G.A., Carlini A.R. (1999) “Spring and summer predation on fish by the Antarctic fur seal, *Arctocephalus gazelle*, at King George Island, South Shetland Islands” *Can.J.Zool*, 77:1157-1160.
- * Darnerud P. O., Aune M., Larsson L., Hallgren S., 2007. *Plasma PBDE and thyroxine levels in rats exposed to Bromkal or BDE-47*. *Chemosphere* 67, 386-392.
- * Darnerud P.O., Eriksen G.S., Johannesson T. et al., 2001, *Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure and toxicology*, *Environmental Health Perspectives* 109, 49-68.
- * Darnerud P.O., 2003, *Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife*, *Environment International* 29 (6), 841-853.
- * Davies C., 1994, *The Mac Millian Press Ltd*, *The immunoassay handbook* ed. David Wild, p.3.
- * de Boer et al., 1999, *New types of persistent halogenated compounds*, *Handbook of Environmental Chemistry* 3, Part K. Berlin/Heidelberg, Germany.
- * de Boer J., de Boer K., Boon J.P. (2000). Polybrominated biphenyls and diphenylethers. In: Paasivirta J, editor. *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 3. Berlin/ Springer-Verlag; 61– 95 part K.
- * De Boer J., Robertson L.W., Dettmer F., Wichmann H., Bahadir M., 1998. *Polybrominated diphenyl ethers in human adipose tissue and relation with watching television - a case study*. *Organohalogen Compounds* 35, 407–410.
- * De Boer J., Wester P.G., Klamer H.J.C., Lewis W.E., Boon J.P., 1998. *Do flame retardants threaten ocean life?* *Nature* 394, 28-29.

- * de Carlo V.J., 1979, *Studies on brominated chemicals in the environment*. Ann. NY. Acad. Sci. 320, 678-681.
- * Defeo, O., McLachlan, A., Schoeman, D.S., Schlacher, T.A., Dugan, J., Jones, A., Lastra, M. & Scapini, F. (2009). Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 81, 1-12.
- * de Wit C.A, 2002, An overview of brominated flame retardants in the environment, *Chemosphere* 46, 583-624.
- * De Wit C.A., Alae M., Muir D.C.G. (2006). "Levels and trends of brominated retardants in the Arctic" *Chemosphere* 64, 209-33.
- * Ethel Eljarrat Agustina De La Cal, David Larrazabal, Begoña Fabrellas, Amadeo Rodriguez Fernandez-Alba, Francesc Borrull, Rosa Maria Marce and Damia Barcelo, 2005, *Occurrence of polybrominated diphenylethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls in coastal sediments from Spain*, Environmental Pollution Volume 136, Issue 3, August 2005, pp. 493-501.
- * Ercolini, A & Scapini, F. (1974). Sun compass and shore slope in the orientation of littoral amphipods (*Talitrus saltator* Montagu). *Monitore Zoologico Italiano (N.S.)* 8, 85-115.
- * Eriksson J., Jakobsson E., Marsh G., Bergman A., 2001. *Photodecomposition of brominated diphenylethers in methanol/water [Abstract]*. Presented at the Second International Workshop on Brominated Flame Retardants, 14–16 May 2001, Stockholm, Sweden.
- * European Union, 2003. Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of the Council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparation (pentabromodiphenyl ether, octaromodiphenyl ether). Available from [http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003\(I-04220030215en00450046.pdf](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003(I-04220030215en00450046.pdf).
- * Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S. (2009). The sandhopper *Talitrus*

saltator (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor of trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 58, 39-44.

- * Frànek M., Kolàr V., Eremin S.A., 1995, *Enzyme immunoassays for S-triazine herbicides and their applications in environmental and food analysis*, *Anal. Kim. Acta* 311, 349-356.
- * Gerecke A. C., et al., 2008, *Brominated flame Retardants-Endocrine-Disrupting Chemicals in the Swiss Environment*, *Chimia* 62 (5), 352-357.
- * Gevao B., Al-Bahloul M., Al-Ghadban A.N., Ali L., Al-Omair A., Helaleh M., Al-Matrouk K., Zafar J., 2006. *Polibrominated diphenyl ethers in indoor air in Kuwait: Implications for human exposure*. *Atmos. Environ.* 40, 1419-1426.
- * Gouin T., Thomas G.O., Chaemfa C., Harner T., Mackay D., Jones K.C., 2006. *Concentrations of decabromodiphenyl ether in air from Southern Ontario: Implications for particle-bound transport*. *Chemosphere* 64, 256–261.
- * Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K. (1983). Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (Ed. by A. McLachlan & T. Erasmus), 547-556, Junk Publ., The Hague.
- * Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V. Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P. Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R. & Watson, R. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319, 948-952.
- * Hardy M.L., 2002. *A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products*. *Chemosphere* 46, 717-728.
- * Harner T., Shoeib S., 2002. *Mesurements of octanol-air partition coefficients (K_{OA}) for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): predicting partitioning in the environment*. *J. Chem. Eng.* 47, 228-232.

- * Hayakawa K., Takatsuki H., Watanabe I., Sakai S., 2004. *PBDEs, PBDD/Fs and MoBPXDD/Fs in the atmosphere and bulk deposition in Kyoto, Japan*. *Chemosphere* 57, 343-356.
- * Hites R.A., 2004. *Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentrations*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 945-956.
- * Hoh E. And Hites R. *Brominated Flame Retardants in the Atmosphere of the East-Central United States*. (2005). *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 7794-7802
- * Hooper K., McDonald T.A., 2000. *The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast milk monitoring programs*. *Environ Health Perspect*, 108, 387-392.
- * Ikonomou M.G., Rayne S., Addison R.F., 2002. *Exponential increases of the brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, in the Canadian arctic from 1981 to 2000*. *Environmental Science and Technology* 36 (9), 1886-1892.
- * Jansson B., Asplund L., Olsson M., 1987. *Brominated flame retardants-ubiquitous environmental pollutants?* *Chemosphere* 16, 2343-2349.
- * Johansson I., Moisan K., Guiot N., Truquet I., Munsch C., Tronczynski J. (2004). *Levels and trends of organohalogen compounds in mussels from the Seine estuary in 1981-2003*. *Organohalogen Compd.* 66, 1868-76.
- * Kannan K., Imagawa T., Blankenship A.L., Giesy J.P. (1998) "Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated naphthalens in soil, sediments and biota collected near the site of a former chlor-alkali plant" *Environmental Science and technology*, 32:2507-2514.
- * Kado N. Y., Wei E. T., 1978, *Radioimmunoassay for benzo-a-pyrene*, *Journal of the National Cancer Institute* 61, 221-225.
- * King J.E. (1983) "Seals of the world" *Oxford University Press, Oxford*.
- * Law R.J., Alaei M., Allchin C.R., Boon J.P., Lebeuf M., Lepom P., Stern G.A., 2003. *Levels and trends of polybrominated diphenyl ethers and other brominated flame*

retardants in wildlife. Environment International 29 (6), 757-770.

- * Law R.J., Allchin C.R., de Boer J., Covaci A., Herzke D., Lepom P., Morris s., Tronczynski J., de Wit C.A., (2006). Levels and trends of brominated flame retardants in the european environment 217, 853-856.
- * Lee R.G.M., Thomas G.O., Jones K.C., 2004. *PBDEs in the atmosphere of three locations in Western Europe*. Environmental Science and Technology 38, 699-706.
- * Marsden, I.D., Rainbow, P.S. & Smith, B.D. (2003). Trace metal concentration in two New Zealand talitrid amphipods: effects of gender and reproductive state and implication for biomonitoring. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 290, 93-113.
- * Masi F., Lepri L., Del Bubba M., Sacco C., Lo Nostro A., Comodo N., 1999. *Organic chemicals and microbial facies of liquid aerosols from a wastewater treatment plant*. Annali di Chimica 89, 231-248.
- * Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S. (2004). Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 300, 373-408.
- * R.W. Macdonalda,T, T. Harnerb, J. Fyfec. Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data (2005)
- * McDonald T.A., 2002, *A prospective on the potential health risk of PBDEs*, Chemosphere 46, 745-755.
- * McPherson A., Thorpe B. and Blake A., 2004, *Brominated Flame Retardants in Dust on Computers: The Case for Safer Chemicals and Better Computer Design*. Computer Take-BackCampaign, <http://www.computertakeback.org/>.
- * Miniero R., Iamicelli A.L. (2008) "Persistant Organic Pollutant" *Ecotoxicology, Elsevier B.V.:2672-2682*.
- * Moon H.B., Kannan K., Lee S.J., Choi M., 2007. *Atmospheric deposition of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in coastal areas in Korea*. Chemosphere 66,

585-593.

- * Moore, P.G. & Rainbow, P.S. (1987). Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia* 73, 120–126.
- * Moore, P.G., Rainbow, P.S. & Hayes, E. (1991). The beach-hopper *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor for copper and zinc: North Sea trials. *Science of the Total Environment* 106, 221–238.
- * Derek C.G. Muir a,*, Ross J. Norstrom. Geographical differences and time trends of persistent organic pollutants in the Arctic. (2000)
- * S.M. Bengtson Nasha,□, A.H. Poulsen, S. Kawaguchi, W. Vetter, M. Schlabach. Persistent organohalogen contaminant burdens in Antarctic krill (*Euphausia superba*) from the eastern Antarctic sector. *Science of The Total Environment* 407 (2008) 304–314.
- * Nowak R., paradise J. (1983) “Walker’s Mammals of the World, 4th Edition “ *Baltimore MD: John Hopkins University Press*.
- * NTP (National Toxicology Program), 1986. *NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of decabromodiphenyl oxide (CAS No. 1163-19-5) in F344?N rats and B6C3F1 mice (feed studies)*. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program .
- * Oftedal O.T., Boness D.J., tedman R.A. (1987) “The behavior, physiology and anatomy of lactation in pinnipedia” *Curr. Mammal*, 1:175-245.
- * Olsman H, Bavel B, Kalbin G, Petterson A, Stenlund S, Strid A, et al. 2002. Formation of dioxin-like compounds as photo-products of decabrominated diphenyl ether (DEBDE) during UV-irradiation. *Organohalogen Compounds* 58, 41–44.
- * Oros D. R., Hoover D., Rodigari F., et al., 2005, Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers in water, surface sediments, and bivalves from the San Francisco Estuary. *Environ Sci Technol*, 39(1): 33-41.
- * Palm A., Cousins I.T., Mackay D., Tysklind M., Metcalfe C., Alee M., 2002. *Assessing*

the environmental fate of chemicals of concern: a case study of the polybrominated diphenyl ethers. Environmental Pollution 117, 195-213.

- * Pardi, L. & Papi, F. (1953). Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno in una popolazione del litorale tirrenico. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 35, 490-518..
- * Pardi, L. & Ercolini, A. (1986). Zonal recovery mechanism in talitrid crustaceans. *Bollettino di Zoologia* 53, 139-160.
- * Palluault, M. (1954). Notes ecologiques sur le *Talitrus saltator*. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 91, 105-129.
- * Peele C., 2004, PBDE Chemical Action Plan: Interim Plan. Washington State, December 31, 2004.
- * Rahman F., Langford K.H., Scrimshaw M.D., Lester J.N., 2001, *Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardant*, *The Science of Total Environment* 275, 1-17.
- * Rainbow, P.S. & White, S.L. (1989). Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia* 174, 245-262.
- * Rainbow, P.S. (1998). Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: *Metal metabolism in aquatic environments* (Ed. by W.J Langston and M.J. Bebianno), 285-319, Chapman and Hall, London.
- * Rainbow, P.S. & Phillips, D.J.H. (1993). Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin* 26, 593-601.
- * Rainbow, P.S. (2006). Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 12, 107-122.
- * Ruppel, G. (1967). Tagesrhythmsche und langfristige Faunenverschiebungen in marinen supralitoral. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 60, 338-375.

- * Schlacher, T.A., Dugan, J., Schoeman, D.S., Lastra, M., Jones, A., Scapini, F., McLachlan, A. & Defeo, O. (2007). Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distribution* 13, 556–560.
- * Schechter A., Papke O., Tung K.C., Staskal D., Birnbaum L. (2004). Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food. *38(20)* 5306-5311.
- * Schiavone A., Corsolini S. (2008) “Biomonitoring of Persistent contaminants, including emerging POPs, in fur seals and penguins, from the South Shetlands Islands, Antarctica” *Dipartimento di Scienze ambientali “G.Sarfatti” – Università di Siena*
- * Sellstrom U., Kierkegaard A., de Wit C., Jansson B., 1998. *Polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from a Swedish river.* *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1065–1072.
- * Shelver et al., Parrotta C., Slavecki R., Li Q., Ikonomou G., Barcelò D., Lacorte S., Rubio F.M., 2008, Development of a magnetic particle immunoassay for polybrominated diphenyl ethers and application to environmental and food matrices, *Chemosphere*, 73, S18-S23.
- * Shen, E. S., and Whitlock, J. P., Jr. (1992). Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 6815–6819.
- * Siddiqi M.K., Laessig R.H., Reed K.D., 2003. *Polybrominated diphenyl ethers: New Pollutants-old diseases.* *Clinical Medicine & Research* 4, 281-290.
- * Sjödin A., Jakobsson E., Kierkegaard A., Marsh G., Sellstrom U., 1998, *Gas chromatographic identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers in a commercial product, Bromkal 70-5DE.* *J. Chromatogr. A* 822, 83-89.
- * Smith A.G. (1991). Chlorinated hydrocarbon insecticides. Classes of pesticides In Hayes E.J., Laws E.R., *Handbook of pesticide toxicology* Academic Press, San Diego, California, 731-915.

- * Smith W.O., Marra J., Hiscock M.R., barber R.T. (2000) "The seasonal cycle of phytoplankton biomass and primary productivity in the Ross Sea, Antarctica" *Deep Sea Res II*, 47:3119-3140.
- * Söderström G., Sellstrom U., de Wit C.A., Tysklind M., 2004, *Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209)*, Environ. Sci. Technol. 38, 127-132.
- * Strandberg B., Dodder N.G., Basu I., Hites R.A., 2001. Concentrations and spatial variation of polybrominated diphenyl ethers and other organohalogen compounds in Great Lakes air. *Environmental Science and Technology* 35, 1078-1083.
- * Streets S. S., Henderson S. A., Stoner A. D., et al., 2006, *Partitioning and bioaccumulation of PBDEs and PCBs in Lake Michigan*. *Environ Sci Technol*, 40(23): 7263-7269.
- * Su Y., Hung H., Sverko E., Fellin P., Li H., 2007. *Multi-year measurements of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the Arctic atmosphere*. *Atmospheric Environment* 41, 8725-8735.
- * Szymanska J.A., 1996. *Toxicity of selected brominated aromatic compounds*. *Rocz Panstw Zakl Hig* 47, 13-23.
- * Ter Schure A.F.H., Larsson P., Merila J., Jonsson K.I., 2002. *Latitudinal fractionation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in frog (Rana Temporaria)*. *Environmental Science and Technology* 36, 5057-5061.
- * Ter Schure A.F.H., Larsson P., Agrell C., Boon J.P., 2004. *Atmospheric transport of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls to the Baltic Sea*. *Environmental Science and Technology* 38, 1282-1287.
- * Ugolini et al. (1999). Moon and sun compasses in sand hoppers rely on two separate chronometric mechanisms. *royal society* 266, 749-752
- * Ugolini A., Scapini F. & Pardi L. (1986). Interaction between solar orientation and landscape visibility in *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology* 90, 449-460.

- * Ugolini A. 1989. Orientation in the water and antipredatory behaviour in sandhoppers. *Marine Behaviour and Physiology*, 14, 223-230.
- * Ugolini A., Borghini F., Calosi P., Bazzicalupo M., Chelazzi G. & Focardi S. (2004). Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin* 48, 526-532.
- * Ugolini A., Borghini F., Focardi S. & Chelazzi G. (2005). Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugolinii* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin* 50, 1328-1334.
- * UNECE (2003) "Pops protocol to the Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution on October 23" http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.htm
- * UNEP (United Nations Environment Programme), (2003) "Global Report 2003. Regionally based assessment of persistent toxic substances" *Geneve*.
- * UNEP (United Nations Environment Programme), (2006) "Antarctic Specially Protected Areas". In UNEP/GRID-Arendal Maps and Graphic Library.
- * Venier M. , Hites R.A., 2008. *Flame retardants in the atmosphere near the Great Lakes*. School of Public and Environment Affairs, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405.
- * Witmann C., Bier F., Eremin S.A., Schimid R.D., 1996, Quantitative analysis of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid in water samples by two immunosensing methods, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 343.
- * Wang X., Ding X., Xianmai B., Qingxie Z., Honhxiang C., Guangsun L., Yingsheng G., Mofu J. and Zeng E. Polybrominated Diphenyl Ethers in Airborne Particulates Collected during a Research Expedition from the Bohai Sea to the Arctic. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 7803-7809
- * Wania F., Mackay D. (1999) "The evolution of mass balance models of persistent organic pollutant fate in the environment" *Environmental Pollution*, 100:223-240.

- * Wania F., Machay D. (1996) "Tracking the distribution of persistent organic pollutants. Control strategies for these contaminants will require a better understanding of how they move around the globe" *Environmental Science and Technology*, 30 (9), 390-396.
- * Wania F., Dugani C.B., 2003. *Assessing the long-range transport potential of polybrominated diphenyl ethers: a comparison of four multimedia models*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1252–1261.
- * Wania F., Mackay D., 1995. *A global distribution model for persistent organic chemicals*. *Sci. Total. Environ.* 160/161, 211-232.
- * Weeks, J.M. & Rainbow, P.S. (1991). The uptake and accumulation of zinc and copper from solution by two species of talitrid amphipods (Crustacea). *Journal of Marine Biology Association of UK* 45, 811-826.
- * Weeks, J.M. & Rainbow, P.S. (1993). The relative importance of food and seawater as sources of copper and zinc to talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda; Talitridae). *Journal of Applied Ecology* 30, 722-735
- * WHO, 1998. *Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans*. International Health Criteria 205, World Health Organisation, Geneva (Switzerland).
- * Wilford B.H., Thomas G.O., Jones K.C., Davison B., Hurst D.K., 2008. Decabromodiphenyl ether (deca-BDE) commercial mixture components, and other PBDEs, in airborne particles at a UK site. *Environment International* 34, 412-419.
- * Wildish, D.J. (1988). Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology* 66, 2340-2359.
- * Yang G, Kille P., Ford A.T. (2008). Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebr
- * Zheng, G.J., Martin M., Richardson B.J., Yu H., Liu, Y., Zhou C., Li J., Hu G., Lam M.H.W., Lam P.K.S., 2004. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Pearl River Delta sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 514–524.