



### In questo numero:

**T**est ecotossicologico con ostracodi *Heterocypris incongruens*: applicazione ai sedimenti degli invasi **3**

**T**est ecotossicologico con piante superiori: applicazione ai sedimenti degli invasi **12**

**T**emperatura e ossigeno disciolto nelle acque lacustri: metodi di misura e applicazioni, con particolare riferimento alle acque profonde **17**

**M**etodo *digital droplet* PCR (ddPCR) per il biomonitoraggio di biomarcatori coinvolti in processi di dechlorazione biologica in matrici contaminate da composti organoclorurati **26**

**News:** **33**

**N**uova guida JRC sugli aspetti idromorfologici dei laghi in Europa **36**

**P**rogetto *MIA Rete natura 2000*. Individuati "nuovi" habitat e specie vegetali lungo i fiumi pugliesi **38**

**H**arnessing Electrobioremediation for Sustainable Groundwater Decontamination: Mechanisms, Applications and Efficacy **43**

**V**alorizzazione di rifiuti organici urbani e bioplastiche per la produzione di acidi carbossilici ad alto valore aggiunto **47**

**E**venti 2025: avvisi di convegni **50**

### Editoriale

L'acqua è una risorsa fondamentale che va tutelata e preservata attraverso una gestione responsabile e innovativa per far fronte alle sfide connesse al cambiamento climatico e alla scarsità idrica. Ma l'acqua non va considerata come a sé stante: è di cruciale importanza considerarla nel suo insieme ed integrata negli ecosistemi.

Il Notiziario si propone, grazie ad una visione multidisciplinare, di far fronte alle esigenze attuali di metodi e strumenti utili per preservare una risorsa fondamentale qual è l'acqua.

La Rivista da quest'anno ha modificato il Comitato Editoriale. Si vuole ringraziare Stefano Polesello per il gran lavoro svolto in questi anni come Responsabile Scientifico della Rivista e al suo fondamentale contributo per il livello rigoroso e l'azione di divulgazione. Il nuovo Responsabile Scientifico è Paola Grenni, ricercatrice *senior* dell'Istituto che, per accrescere la visione multidisciplinare della Rivista, ha ampliato il Comitato Editoriale, facendo attenzione che tutte le cinque sedi dell'Istituto fossero qui rappresentate.

Si ringrazia dunque le *new entries*: Bruna Maturro, Isabella Parlapiano e Marzia Ciampitiello, oltre agli "storici" Luigi Campanella, Anna Maria De Girolamo, Licia Guzzella, Luisa Patrolecco, Sara Valsecchi, nonché Domenica Mosca Angelucci insieme a Carolina Cruz Viggì, entrate lo scorso 2024.

Il nuovo numero del Notiziario riporta diversi studi interessanti. I primi due articoli riguardano la caratterizzazione della tossicità dei sedimenti dei bacini mediante test ecotossicologici utilizzando un crostaceo (*Heterocypris incongruens*) e dei phytotest con piante (*Sorghum saccharatum*, sorgo; *Lepidium sativum*, crescione e *Sinapis alba*, senape). Tali test sono utili, nell'ambito del recente D.M. 205 del 12 ottobre 2022, per la redazione del progetto di gestione degli invasi e nello specifico per la gestione dei sedimenti che necessitano di frequenti movimentazioni (fluitazioni e dragaggi) per il mantenimento della capacità utile di questi bacini. Allo stato attuale, infatti, i saggi di contatto standardizzati su sedimenti di acqua dolce sono relativamente pochi e alcuni aspetti (allestimento dei test e interpretazione dei risultati), restano da chiarire, prima di renderli utilizzabili su larga scala ai fini della valutazione del rischio ambientale.

Il terzo articolo riguarda i laghi ed in generale ambienti lentici, sia naturali che artificiali, oggetto di monitoraggio del nostro Istituto da decenni. Tali monitoraggi (qualità delle acque e dei sedimenti, in relazione all'evoluzione degli ecosistemi) hanno permesso di raccogliere serie storiche importanti per alcuni specifici corpi idrici preziose anche per verificare gli impatti dei cambiamenti climatici in corso. Le variazioni e i processi che stanno interessando gli ecosistemi lacustri in risposta al riscaldamento climatico necessi-



tano di dati regolari ed affidabili per poter essere descritti e compresi. Variabili apparentemente di facile acquisizione come temperatura e ossigeno disciolto sono fondamentali per una descrizione delle dinamiche in corso ma richiedono metodiche affidabili e confrontabili nel tempo. In questo numero del Notiziario viene presentato un confronto approfondito tra metodiche in uso e di nuova acquisizione, in particolare per garantire le confrontabilità dei dati nel lungo periodo, fondamentale negli studi a lungo termine per la misura di temperatura e ossigeno per una valutazione delle loro variazioni spaziali (es. lungo la colonna d'acqua lacustre) e temporali (stagionali e pluriennali).

Infine, viene illustrato un metodo innovativo di metagenomica, il *Digital droplet* PCR (ddPCR) proposto come strumento efficace per il biomonitoraggio di matrici contaminate nel contesto di interventi di biorisanamento. Viene presentato un protocollo applicativo, sviluppato dal Laboratorio di Microbiologia Ambientale e Biologia Molecolare dell'IRSA, per l'analisi di biomarcatori coinvolti in processi di dechlorazione biologica in matrici contaminate da composti organoclorurati.

Vengono illustrati gli elementi positivi del metodo (maggiore precisione ed accuratezza del dato, superando la necessità di utilizzo di rette di calibrazione) rispetto ai quelli tradizionalmente utilizzati (es. Real Time PCR-qPCR). L'articolo riporta un'applicazione per la quantificazione dei principali biomarcatori della dechlorazione degli organoclorurati, su consorzi di dechlorazione e campioni ambientali contaminati, confrontando i dati ottenuti con quelli della qPCR. I risultati evidenziano la robustezza e l'accuratezza del metodo, dimostrando il suo potenziale per il biomonitoraggio ambientale di matrici contaminate da organoclorurati, per la quantificazione di geni biomarcatori coinvolti nei processi di biodegradazione/biotrasformazione anche di altre classi di idrocarburi.

Gli articoli, dunque, testimoniano ancora una volta l'impegno del nostro Istituto per la messa punto di protocolli e metodi per

la caratterizzazione chimica ed ecotossicologica delle acque e dei sedimenti, nonché di metagenomica delle comunità microbiche e di geni relati alla biodegradazione di contaminanti con l'obiettivo di mettere al servizio le proprie competenze per colmare le lacune conoscitive e offrire strumenti utili per il monitoraggio e la protezione degli ecosistemi acquatici.

Buona lettura!



*Il nuovo Direttore Scientifico  
Paola Grenni*

**Giuseppe Mascolo**  
*Direttore Responsabile*

# Test ecotossicologico con ostracodi *Heterocypris incongruens*: applicazione ai sedimenti degli invasi

a cura di

Laura Marziali (\*), Lucia Valsecchi, Michele Cappetta, Maria Teresa Palumbo, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Brugherio (MB).

## RIASSUNTO

Il saggio subcronico di contatto su sedimenti d'acqua dolce con l'ostracode *Heterocypris incongruens* (protocollo ISO 14371:2012) offre ottime potenzialità nella caratterizzazione del rischio legato a sedimenti contaminati. Tuttavia, alcuni aspetti procedurali vanno meglio definiti per ridurre le interferenze sugli endpoint mortalità e inibizione della crescita dovute a: 1) tipo di alimento algale fornito agli organismi; 2) torbidità della soluzione; 3) presenza di percentuali rilevanti di frazioni fini nei sedimenti da testare. Per valutare le interferenze sulle risposte, sono stati condotti esperimenti ad hoc utilizzando sedimenti prelevati da diversi invasi lombardi. I risultati indicano che: 1) il tipo di alimento algale incide sulla crescita degli organismi e l'alimento raccomandato è *Scenedesmus* spp.; 2) la torbidità della soluzione incide sulla sopravvivenza e può essere minimizzata avendo cura di lasciare decantare le frazioni fini in sospensione nel mezzo di coltura prima di iniziare il test; 3) la crescita degli organismi diminuisce al diminuire della dimensione delle particelle del substrato: la soglia di tossicità, calcolata come massima inibizione rispetto al controllo che rientra nella variabilità naturale del test (MTI = *Maximal Tolerable Inhibition*), è del 30%, confermando la soglia del 35% calcolata da Casado-Martinez et al. (2016). Questi elementi conoscitivi sono necessari per la corretta applicazione del test ai sedimenti degli invasi, ad esempio nelle caratterizzazioni ai fini delle fluitazioni e asportazioni meccaniche, e per l'interpretazione delle risposte.

## SUMMARY

The subchronic freshwater sediment contact test with the ostracod *Heterocypris incongruens* (ISO 14371:2012 protocol) offers excellent potential in the environmental risk assessment linked to contaminated sediments. However, some procedural aspects need to be better defined to reduce interference on mortality and growth inhibition endpoints, which may be induced by: 1) the type of algal food supplied to the organisms; 2) the turbidity of the solution; 3) the presence of significant percentages of fine fractions in the test sediments. To evaluate the interferences on the responses, ad hoc experiments were conducted using sediments collected in various reservoirs of Lombardy Region. The results indicate that: 1) the type of algal food affects the growth of the organisms and the recommended food is *Scenedesmus* spp.; 2) the turbidity of the solution affects survival and can be minimized by allowing the suspended fine fractions to be decanted before starting the test; 3) the growth of the organisms decreases as the size of the substrate particles decreases: the toxicity threshold, calculated as the maximum inhibition compared to the control which falls within the natural variability of the test (MTI = *Maximal Tolerable Inhibition*), is 30%, confirming the threshold of 35 % calculated by Casado-Martinez et al. (2016). This knowledge is necessary for the correct application of the test on sediments of reservoirs, as may be requested in the characterizations of sediment toxicity before flushing or mechanical removal, and for the interpretation of the responses.

## 1. INTRODUZIONE

Il saggio su sedimento con l'ostracode *Heterocypris incongruens* (Figura 1), eseguito secondo il protocollo ISO 14371:2012, è un test di ampio utilizzo per la caratterizzazione sia di suoli che di sedimenti d'acqua dolce (es. ISPRA, 2013; Mariani et al., 2020). Tuttavia, l'applicazione ai sedimenti fini, come quelli che caratterizzano laghi e invasi, potrebbe presentare alcune limitazioni: in particolare, alcune ricerche hanno mostrato la potenziale sensibilità del test alla presenza di granulometrie fini (CESI, 2005; Casado-Martinez et al., 2016). Secondo questi studi, infatti, i sedimenti caratterizzati da percentuali elevate di frazioni fini non sembrano incidere sull'endpoint mortalità, mentre potrebbero influire sulla crescita degli or-

ganismi, determinando una parziale inibizione della crescita. Una possibile soluzione potrebbe essere quella di utilizzare come sedimento di controllo un substrato di granulometria simile a quella del campione da testare: questo approccio risulta però poco praticabile, sia perché la composizione granulometrica dei diversi campioni può variare molto, sia perché altre caratteristiche potrebbero influire sui risultati, come la percentuale di sostanza organica o la presenza di altre sostanze. Un'alternativa può essere quella di determinare la variabilità naturale dell'endpoint in sedimenti naturali con un'ampia gamma di proprietà fisico-chimiche e bassi livelli di contaminazione: questo approccio è stato utilizzato da Casado-Martinez et al. (2016), che hanno così calcolato una soglia eco-

\* [laura.marziali@irsa.cnr.it](mailto:laura.marziali@irsa.cnr.it)



**Figura 1.** Esemplare di *Heterocypris incongruens*. Foto: Shawn Brescia (<https://www.inaturalist.org/photos/332707916>)

tossicologica del 35% per l'inibizione della crescita, utile per distinguere la variabilità naturale, determinata anche dalla granulometria dei sedimenti, da un effetto tossico significativo.

Per approfondire ulteriormente questo aspetto, è stato effettuato questo studio, realizzato nell'ambito di un Accordo di collaborazione tra CNR-IRSA e Regione Lombardia, in collaborazione con l'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Lombardia (ARPA Lombardia), finalizzato alla messa a punto di un protocollo di caratterizzazione della tossicità dei sedimenti degli invasi lombardi, ai fini della fluitazione e di altre operazioni che determinano la movimentazione dei sedimenti nel corpo idrico di valle (Marziali et al., 2017a e 2017b). L'applicazione del test con ostracodi sui sedimenti di alcuni invasi, caratterizzati da granulometrie molto fini (es. Figura 5), ha dato esiti inaspettati, mostrando elevata mortalità e/o elevata inibizione della crescita, non spiegabili sulla base dei risultati della caratterizzazione chimica dei sedimenti stessi e, quindi della loro tossicità attesa. Per queste ragioni, si è deciso di condurre ulteriori approfondimenti sull'applicabilità del test ai sedimenti degli invasi, in particolare in presenza di elevate percentuali di frazioni fini.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il saggio con l'ostracode *Heterocypris incongruens* è un test subcronico di contatto, della durata di 6 giorni, che si può eseguire su sedimenti freschi d'acqua dolce, setacciati al vaglio dei 2 mm. La procedura è altamente standardizzata (protocollo ISO 14371:2012) e permette di valutare l'effetto su due endpoints: la mortalità e l'inibizione della crescita. Il test prevede l'allestimento di 6 repliche per ciascun trattato e per il controllo, ognuna contenente 10 organismi, che vengono inseriti subito dopo la schiusa delle uova.

I risultati ottenibili da un saggio acuto costituiscono solitamente il primo passo nella valutazione del rischio per la vita acquatica. L'assenza di effetti acuti non preclude la possibilità di effetti cronici.

## 3. CAMPO DI APPLICAZIONE

*H. incongruens* è un organismo cosmopolita, autoctono in Italia, che vive a contatto con i sedimenti in pozze d'acqua, stagni e piccoli laghi. Il saggio è uno dei

più standardizzati e utilizzati su sedimento, grazie alla breve durata rispetto, ad esempio, ai test con i Ditteri *Chironomus* o con i Crostacei *Hyalella azteca* (durata 10 o 28 giorni per i test, rispettivamente, subcronico e cronico). Inoltre, questi organismi non necessitano di allevamenti di mantenimento, in quanto possono essere schiusi all'occorrenza da cisti durature, che si conservano facilmente a 4 °C per diversi mesi. Infine, le limitate dimensioni di questi organismi (150-900 µm di lunghezza) permettono di allestire il test in recipienti di piccole dimensioni, con piccoli quantitativi di sedimento (1 mL per ciascuna replica, per un totale di 6 mL di campione, setacciato a 2 mm). In commercio è disponibile un kit per l'esecuzione di questo test (Ostracodtookit F™, MicroBioTest Inc.), contenente le cisti e tutti i materiali e reagenti necessari. Il nutrimento degli organismi, costituito prevalentemente da alghe, può essere reperito facilmente in commercio: sono infatti necessarie *Spirulina* essiccata, che viene venduta anche come integratore alimentare, e alghe verdi vive, quali *Scenedesmus* spp. o *Raphidocelis subcapitata* (prima chiamata *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata*), che vengono vendute immobilizzate in una matrice inerte che permette la conservazione a 4 °C per alcuni mesi.

## 4. APPARECHIATURE

- 4.1 Camera termostata o incubatore (temperatura 25±1 °C);
- 4.2 Lampada a led con potenza di illuminazione di 3000-4000 lux;
- 4.3 Stereomicroscopio a diversi ingrandimenti, possibilmente con illuminazione sia riflessa che trasmessa ed eventualmente dotato di fotocamera, con cui effettuare fotografie degli organismi per la misurazione della loro lunghezza mediante software di misurazione. In alternativa alla fotocamera, per la misurazione della lunghezza degli organismi è possibile utilizzare un vetrino di calibrazione dotato di micrometro, con unità di misura minima di 50 µm;
- 4.4 Aeratore per acquari per ossigenare l'acqua standard prima del test;
- 4.5 Setacciatore con setaccio con maglie da 2 mm, per ottenere la frazione di sedimento fresco passante al vaglio dei 2 mm, da utilizzare nel test.

## 5. REAGENTI E MATERIALI

- 5.1 Cisti di *H. incongruens*, reperibili in commercio;
- 5.2 Polvere di alga *Spirulina* essiccata, necessaria per il nutrimento dei nauplii appena schiusi;
- 5.3 Soluzione di alghe verdi della concentrazione di  $1,5 \times 10^7$  cell/mL, derivanti da colture di laboratorio o reperibili in commercio, immobilizzate in una matrice inerte, da cui è possibile risospendere le alghe all'occorrenza;
- 5.4 Capsule Petri per la schiusa delle uova;
- 5.5 Piastre con 6 pozzetti del diametro di 3,5 cm, per la conduzione del test;
- 5.6 Sedimento standard: sabbia di granulometria ≤2 mm, non calcarea e non tossica, reperibile

- in commercio;
- 5.7 Acqua standard di durezza moderata (formula US EPA 300118, *Standard Freshwater*), reperibile in commercio;
- 5.8 Parafilm, per coprire le piastre durante il test;
- 5.9 Micropipette di vetro con becco ricurvo, che permettono di trasferire nei pozzetti gli organismi appena schiusi;
- 5.10 Pipette Pasteur di plastica con volume di 3 mL;
- 5.11 Cucchiaino del volume di 500 µL o 1000 µL, per misurare il volume di sedimento da inserire in ogni replica;
- 5.12 Spatolina in plastica;
- 5.13 Microsetaccio con maglie da 100 µm, per recuperare gli organismi alla fine del test;
- 5.14 Piastra multipozzetto con pozzetti di dimensioni 1 x 1 cm, in cui trasferire organismi singoli per la misura della lunghezza;
- 5.15 Soluzione di Lugol per fissare gli organismi nella piastra multipozzetto e poter così effettuare la misurazione della lunghezza;
- 5.16 Acqua deionizzata;
- 5.17 Polvere di caolino, atossica;
- 5.18 Sabbie per acquario di granulometria differente (125-250 µm).

## 6. PROCEDURA

La procedura per l'esecuzione del test secondo il protocollo ISO 14371:2012 è descritta in dettaglio in Mariani et al. (2020).

Gli *endpoints* considerati sono:

- mortalità, calcolata come:

$$\text{Mortalità (\%)} = \frac{c-t}{c} \times 100 \quad (1)$$

dove: c = numero di organismi sopravvissuti nel controllo; t = numero di sopravvissuti nel trattato;

- inibizione della crescita, calcolata come:

$$\text{Inibizione (\%)} = 100 - (At - Ac) \times 100 \quad (2)$$

dove: Ac = accrescimento medio degli organismi del controllo, calcolato come lunghezza media degli organismi a fine test meno la lunghezza media di 10 organismi misurati alla schiusa; At = accrescimento medio degli organismi del trattato, calcolato, come per il controllo, rispetto agli organismi appena schiusi.

I criteri di validità del test sono:

- per il controllo, una mortalità ≤ 20%;
- la lunghezza media degli ostracodi nel controllo deve essere almeno 1,5 volte superiore alla lunghezza media degli organismi all'inizio del test;
- per poter considerare l'*endpoint* inibizione della crescita, è necessario che la mortalità registrata nel campione sia < 30%.

Per calcolare le soglie di tossicità per i due *endpoints*, che prendano in considerazione la variabilità naturale di questi parametri, si è utilizzato il calcolo dell'inibi-

zione massima tollerabile (%MTI; Casado-Martinez et al., 2016), applicando la formula:

$$\%MTI = \text{media}(\%I_t) + \text{dev. st.}(\%I_c) \quad (3)$$

dove *media*(%I<sub>t</sub>) e *dev.st.*(%I<sub>c</sub>) sono rispettivamente la media e la deviazione standard dell'inibizione percentuale dell'*endpoint* in un sedimento (t) rispetto al rispettivo controllo (c). L'inibizione percentuale è calcolata utilizzando le equazioni 1 e 2. Le soglie così calcolate per i due *endpoints* sono state poi approssimate al multiplo di 5 più vicino. La %MTI rappresenta l'inibizione massima rispetto al controllo che rientra nella variabilità naturale dell'*endpoint* in certe condizioni test.

## 7. INTERFERENZE

Il protocollo ISO 14371:2012 prevede che la sospensione algale da fornire agli organismi abbia una concentrazione di 1,5 × 10<sup>7</sup> cell/mL, indipendentemente dal tipo di alga verde usata. Tuttavia, *Scenedesmus* presenta una dimensione più elevata rispetto a *Raphidocelis*, pertanto, a parità di concentrazione, la biomassa introdotta nei pozzetti potrebbe essere diversa a seconda della specie di alga. Inoltre, le proprietà nutrizionali delle diverse specie di alghe potrebbero essere diverse. Questi elementi potrebbero quindi influire sulla crescita degli organismi.

Un altro aspetto importante è la possibile interferenza dovuta alla torbidità della soluzione, legata alla presenza di frazioni fini nei sedimenti. In CESI (2005) si evidenziava la necessità di porre molta cura durante l'allestimento del test, per minimizzare la risospensione del sedimento fine ed evitare così di indurre sofferenza negli organismi, non legata all'effettiva tossicità del substrato. Negli esperimenti condotti, infatti, era stata registrata elevata mortalità in presenza di soluzioni torbide. La presenza di frazioni importanti di sedimenti fini (limo, argille), comunque, anche se ben sedimentate, potrebbe determinare una inibizione della crescita, come evidenziato in CESI (2005) e da Casado-Martinez et al. (2016). La torbidità potrebbe infatti determinare un impatto fisico, incidendo ad esempio sulla funzionalità delle branchie degli organismi, oppure potrebbe interferire sulla loro alimentazione, determinando elevata mortalità o inibendo la crescita per un minor apporto di nutrienti, a parità di materiale ingerito da questi organismi filtratori.

## 8. APPLICAZIONE AI SEDIMENTI DEGLI INVASI LOMBARDI

Sono stati condotti alcuni esperimenti per approfondire la comprensione delle risposte del test, sia in relazione al tipo di alimento algale, sia se applicato a sedimenti ricchi di granulometrie fini, come quelli di diversi invasi lombardi, con lo scopo di perfezionare alcune procedure di allestimento e conduzione del saggio, utili per minimizzare le interferenze sopra evidenziate.

### 8.1 Tipo di alimentazione fornita agli ostracodi

Per valutare l'influenza sulla crescita degli organismi del tipo di alimento, ossia della specie di alga verde

utilizzata nel test e della concentrazione della soluzione algale, sono state confrontate le dimensioni alla fine del test degli organismi del controllo, nutriti con due tipi diversi di alghe, *Scenedesmus* spp. e *R. subcapitata*, e con diverse concentrazioni.

Sono stati qui raggruppati tutti i risultati relativi ai controlli dei test effettuati presso il CNR-IRSA negli ultimi anni, alcuni condotti utilizzando *Scenedesmus* spp. a concentrazione di  $1,5 \times 10^7$  cell/mL, e altri con *R. subcapitata* a diverse concentrazioni ( $1,5 \times 10^7$  e  $3,0 \times 10^7$  cell/mL) (Figura 2). Si nota che l'accrescimento degli organismi nutriti con *Scenedesmus*, dopo i 6 giorni di esposizione previsti dal test, è compreso tra 2,9 e 3,8 volte (rispetto alle dimensioni iniziali degli organismi), mentre per quelli nutriti con *Raphidocelis* l'accrescimento è compreso tra 1,6 e 2,7 volte, ossia significativamente inferiore (t-test,  $p < 0,05$ ). Questo risultato non cambia raddoppiando la concentrazione delle cellule di *Raphidocelis* per raggiungere una biomassa paragonabile a quella di *Scenedesmus* (Figura 1): questo dato dimostra che probabilmente l'esito è dovuto alla qualità dell'alimento, più che alla sua quantità. I test effettuati con *Raphidocelis* risultano in alcuni casi al limite dei criteri di validità del test, che prevedono un accrescimento di almeno 1,5 volte. Questo risultato indica l'importanza della scelta dell'alga per la conduzione di questo test. Inoltre, va sottolineato che le dimensioni finali degli organismi nutriti con *Scenedesmus* è risultata in media di  $670 \pm 56 \mu\text{m}$ , mentre per quelli nutriti con *Raphidocelis* di  $471 \pm 73 \mu\text{m}$ : sarebbe auspicabile utilizzare l'alimento che consente la maggior crescita degli organismi, allo scopo di minimizzare l'incertezza nella misurazione delle dimensioni finali degli organismi, in particolare se si utilizza un micrometro con suddivisioni minime di  $50 \mu\text{m}$ , che implicano, quindi, necessariamente, un'approssimazione per eccesso o per difetto della misurazione.

### 8.2 Torbidità nel medium di coltura

Per valutare l'influenza sulla sopravvivenza della torbidità della soluzione, che può presentarsi soprattutto in presenza di elevate concentrazioni di frazioni fini (argille), sono stati condotti alcuni esperimenti, che hanno permesso di fornire indicazioni utili per minimizzare la risospensione durante l'allestimento.

Innanzitutto, sono da evitare operazioni di agitazione delle piastre che potrebbero risospingere il particolato, creando torbidità nella soluzione. In alcuni protocolli, tra cui APAT (2004) e Chial e Persoone (2002), viene suggerito di agitare le piastre durante l'esposizione del test per risospingere le alghe e renderle maggiormente disponibili per gli ostracodi. Tuttavia, il rischio, nei casi di test eseguiti su sedimenti molto fini, è quello di risospingere anche il particolato fine decantato, creando torbidità. La prova è stata effettuata sui controlli, confrontando piastre agitate e non agitate durante l'esposizione: i risultati mostrano che questa pratica non sembra apportare un beneficio significativo sull'accrescimento degli ostracodi (t-test,  $p = 0,047$ ) (Figura 2). È pertanto da evitare, soprattutto se il test riguarda la valutazione della tossicità di sedimenti caratterizzati da percentuali significative di frazioni fini.

Per valutare l'interferenza della torbidità sugli esiti del test, una prova preliminare è stata condotta utilizzando della polvere di caolino come substrato, ossia il più fine a disposizione. Il test è stato condotto utilizzando due piastre per il caolino: la prima è stata allestita poco prima dell'inserimento degli ostracodi, aggiungendo al substrato, come da protocollo, 2 mL di acqua standard (medium), senza attenzioni particolari rispetto alla potenziale risospensione della polvere nella soluzione; la seconda è stata invece allestita la sera precedente con 1 mL di medium ed aggiungendo, al momento dell'inserimento degli ostracodi, un ulteriore mL di medium ben aerato. All'inizio del test, la prima piastra risultava molto torbida, mentre nella seconda il caolino risultava ben sedimentato al fondo

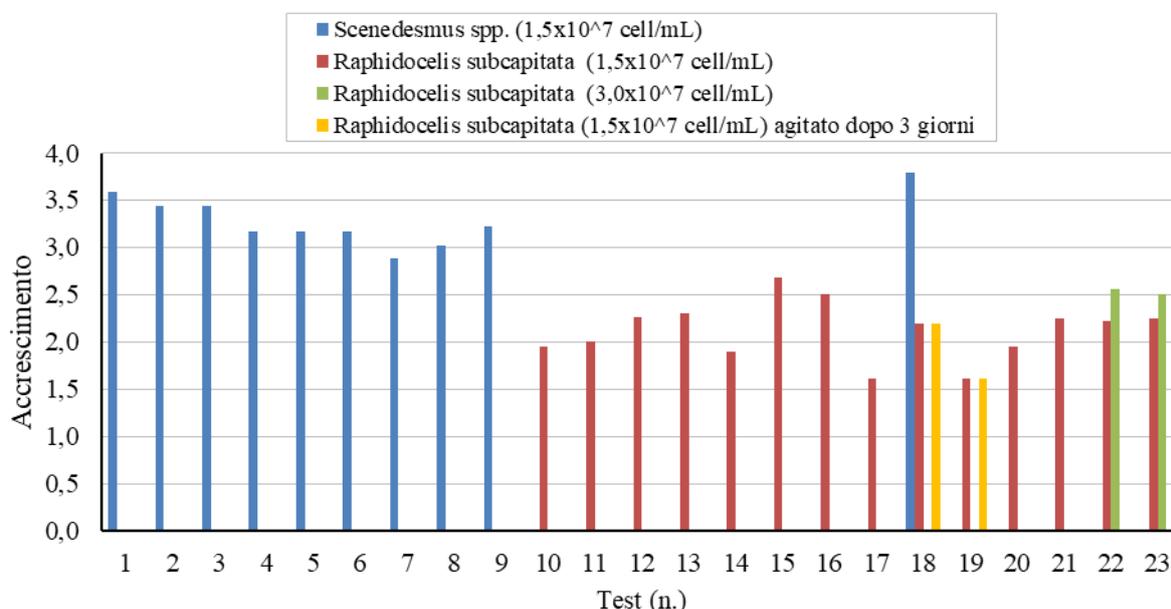


Figura 2. Accrescimento medio degli ostracodi nei controlli di diversi test (test n. da 1 a 23, eseguiti in diverse date nel periodo 2018-2022), al variare del tipo e/o della concentrazione di alimento algale



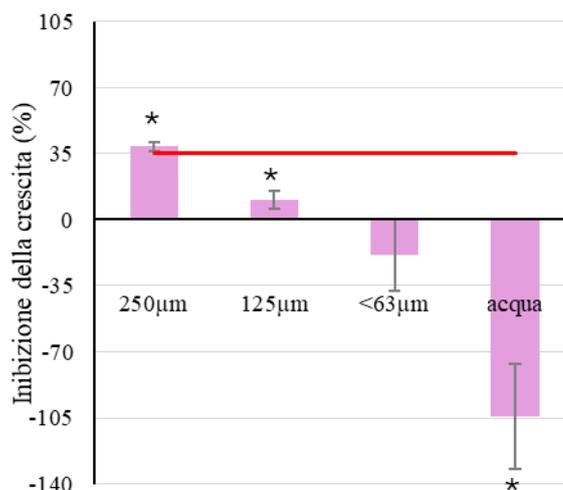
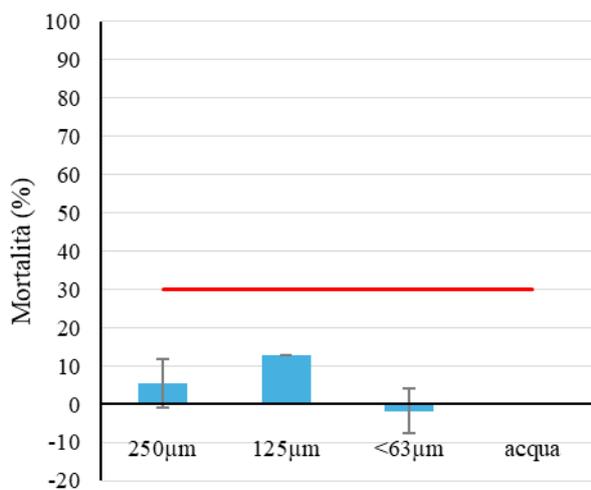
**Figura 3.** Allestimento del test con polvere di caolino: si nota come, dopo 12 ore di decantazione, il substrato risulta ben decantato e il medium del test non mostra torbidità evidente

e il medium di coltura era trasparente (Figura 3). Al termine del test, nella prima piastra è stata osservata una mortalità del 90% rispetto al controllo (dati non mostrati), mentre nella seconda piastra la mortalità osservata è stata del 5% (Figura 4). Questa prova mostra la necessità, nel caso di sedimenti molto fini, di allestire il test almeno 12 ore prima, per consentire la decantazione delle particelle fini.

I test condotti sulle altre sabbie da acquario, più grossolane, non ha invece mostrato criticità particolari durante l'allestimento, in quanto le particelle tendono a rimanere sedimentate nei pozzetti. La mortalità è risultata al di sotto della soglia considerata significativa (30%) (Figura 4a). L'inibizione della crescita è risultata inferiore o prossima alla soglia del 35% (Figura 4b), mostrando l'assenza di una relazione tra questo endpoint e la presenza di granulometrie fini.

L'inibizione della crescita in presenza di particelle fini

potrebbe essere dovuta a due meccanismi: 1) effetto fisico della torbidità sugli organismi, ad esempio per occlusione degli organi respiratori; 2) valore nutritivo delle particelle ingerite che, nel caso di sedimenti fini, sono costituite da alghe mischiate a sedimento di basso valore nutritivo. La prima ipotesi è supportata dall'esperienza sopra riportata con il caolino, che mostra come la presenza di particelle sospese nel medium può indurre mortalità. La seconda ipotesi può essere supportata dall'effetto di forte biostimolazione (> 100%) osservato per il campione denominato "acqua", allestito senza substrato (Figura 4b): in questo caso, l'alimentazione, costituita da sole alghe, quindi con alto valore nutritivo, potrebbe spiegare perché le dimensioni degli organismi sono risultate doppie rispetto a quelle osservate nel controllo, dove l'alimento si può mischiare con le particelle di substrato minerale privo di nutrienti.



a)

b)

**Figura 4.** Risultati del test con ostracodi applicato a sabbie per acquario di diversa granulometria (250 e 125 µm), alla polvere di caolino (< 63 µm) e ad una piastra senza substrato (acqua). **a)** mortalità (media ± deviazione standard) (la linea rossa rappresenta la soglia del 30%); **b)** inibizione della crescita (media ± deviazione standard) (la linea rossa rappresenta la soglia del 35%). Gli asterischi indicano le differenze significative rispetto al controllo (ANOVA seguito da test post-hoc di Dunnett, p < 0,05)

### 8.3 Presenza di frazioni granulometriche fini nei sedimenti

Per valutare l'influenza della granulometria sulla mortalità e crescita degli organismi, è stato condotto un esperimento che prevedeva di esporre gli ostracodi a diverse frazioni granulometriche ottenute tramite setacciatura di sedimenti prelevati in diversi invasi lombardi. Dato che le concentrazioni dei contaminanti sono più elevate nelle frazioni fini dei sedimenti, che fungono da adsorbenti per metalli e composti organici, sono stati selezionati, tra gli invasi, casi caratterizzati da concentrazioni limitate di sostanze tossiche, possibilmente al di sotto delle soglie di *Sediment Quality Guidelines* pubblicate in letteratura (SQGs, MacDonald et al., 2000) (es. Invaso A, Figura 5), e altri con composizione granulometrica paragonabile, ma con superamenti delle SQGs ed evidenze pregresse di tossicità (es. Invaso B, Figura 5). In questo modo, utilizzando i primi, è possibile valutare la risposta di *Heterocypris* alla sola granulometria, mentre i secondi possono essere considerati come controllo positivo per valutare la risposta alla granulometria, ma in presenza di contaminanti.

L'esperimento è stato così condotto: un'aliquota fresca dei sedimenti freschi di ciascun invaso è stata setacciata mediante vibrosetaccio per 1 ora, utilizzando una serie di setacci con maglie rispettivamente da 2 mm, 1 mm, 250 µm, 125 µm, 63 µm. Per massimizzare la separazione delle diverse frazioni, il sedimento accumulato nei singoli setacci dopo la setacciatura meccanica è stato accuratamente lavato con acqua deionizzata. Per ottenere la frazione argillosa, piccole aliquote del passante al vaglio dei 63 µm sono state poste in siringhe di polietilene con acqua deionizzata e filtrate utilizzando membrane di policarbonato di porosità 3 µm. Le singole frazioni così ottenute, quando la quantità è risultata sufficiente, sono state utilizzate per condurre i test su ostracodi secondo il protocollo ISO 14371:2012, e, in parte, sono state liofilizzate per condurre l'analisi chimica degli elementi in traccia (mediante ICP-OES) su tutte le frazioni, per ottenere una valutazione delle concentrazioni di elementi in traccia a cui gli ostracodi sono

stati esposti durante il test.

Il test ecotossicologico è stato eseguito utilizzando *R. subcapitata* come alimento per gli ostracodi, con una concentrazione di  $1,5 \times 10^7$  di cellule per mL, in analogia con quanto eseguito da molti laboratori pubblici e privati in Italia. I pozzetti sono stati allestiti la sera prima del test, per permettere la decantazione delle granulometrie più fini.

La mortalità è risultata inferiore alla soglia del 30% in tutti i casi (Figure 6a e 7a). Si nota, in generale, un lieve incremento della mortalità media al diminuire delle dimensioni delle particelle, ma l'effetto resta comunque a livelli considerati al di sotto della significatività ambientale.

L'inibizione della crescita mostra un incremento più marcato al diminuire delle dimensioni delle particelle del substrato (Figure 6b e 7b), mostrando, in alcuni casi, il superamento della soglia di tossicità del 35% proposta da Casado-Martinez et al. (2016). In particolare, per l'Invaso A l'inibizione della crescita resta inferiore o a cavallo della soglia del 35%, confermando che l'interferenza dovuta alla granulometria, in assenza di altri fattori noti di tossicità, resta confinata entro questa soglia. Per quanto riguarda la frazione < 3 µm, nell'Invaso A si evidenzia una forte biostimolazione (Figura 6b): questo materiale è risultato costituito prevalentemente da sostanza organica, di probabilmente origine algale, e quindi verosimilmente dotato un certo valore nutritivo per gli ostracodi.

Per l'Invaso B, invece, l'inibizione della crescita è risultata significativa per le granulometrie più fini: in questo caso, è quindi verosimile che l'effetto sia dovuto alla tossicità indotta dalla presenza di sostanze tossiche, quali ad esempio l'arsenico che, per questo invaso, come in diversi invasi delle Alpi Centrali, è noto raggiungere livelli potenzialmente tossici. Nei campioni qui testati, l'As è risultato raggiungere concentrazioni di  $225 \text{ mg kg}^{-1}$  p.s.: questo metalloide, sebbene ascrivibile ad origine geogenica, può determinare effetti tossici su organismi non adattati, come gli *Heterocypris* utilizzati nei test.

Interessante osservare che i risultati ottenuti sui sedi-

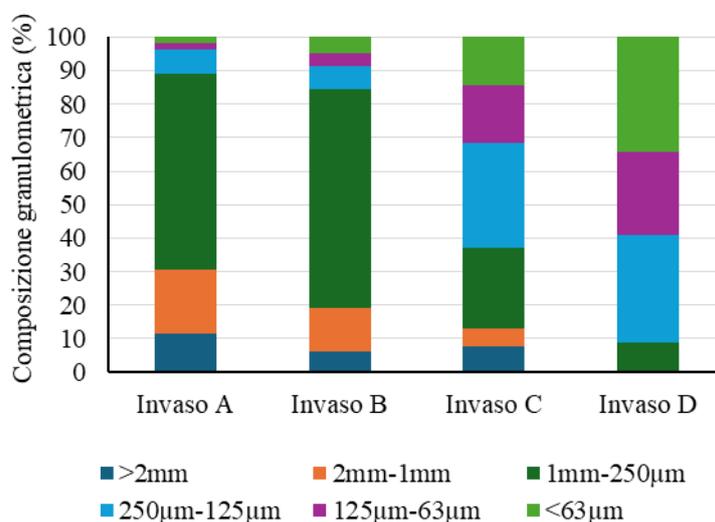
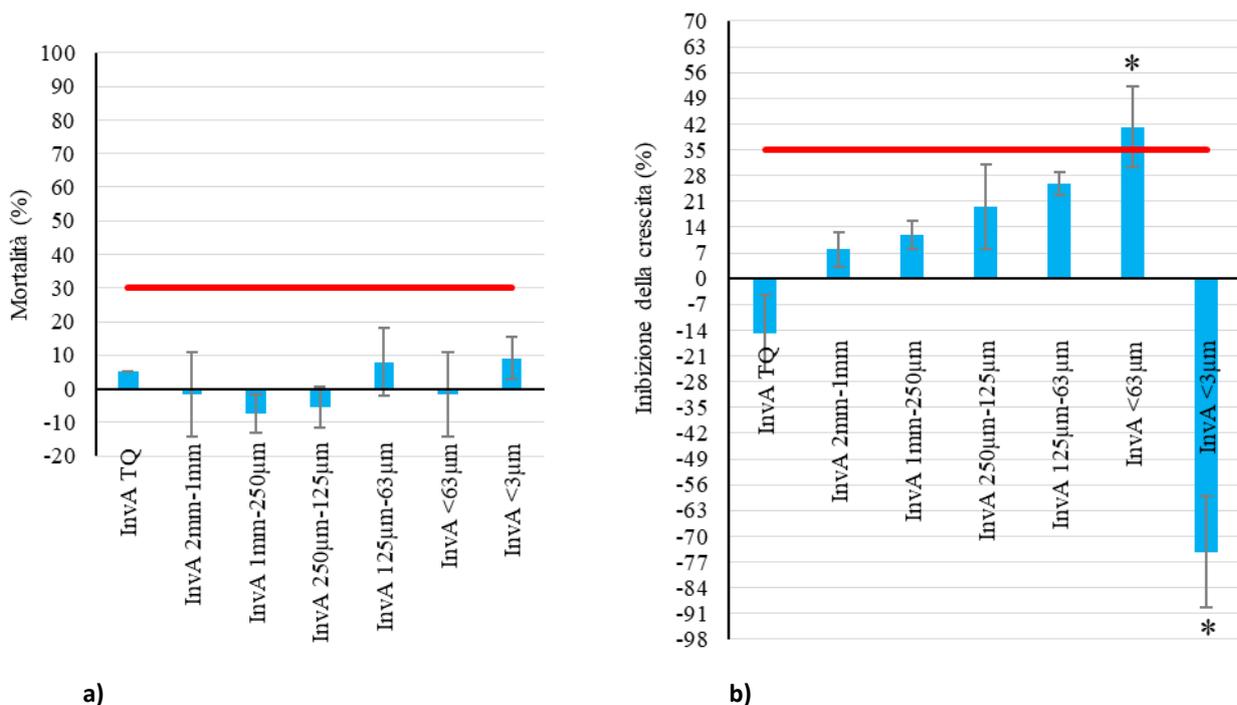


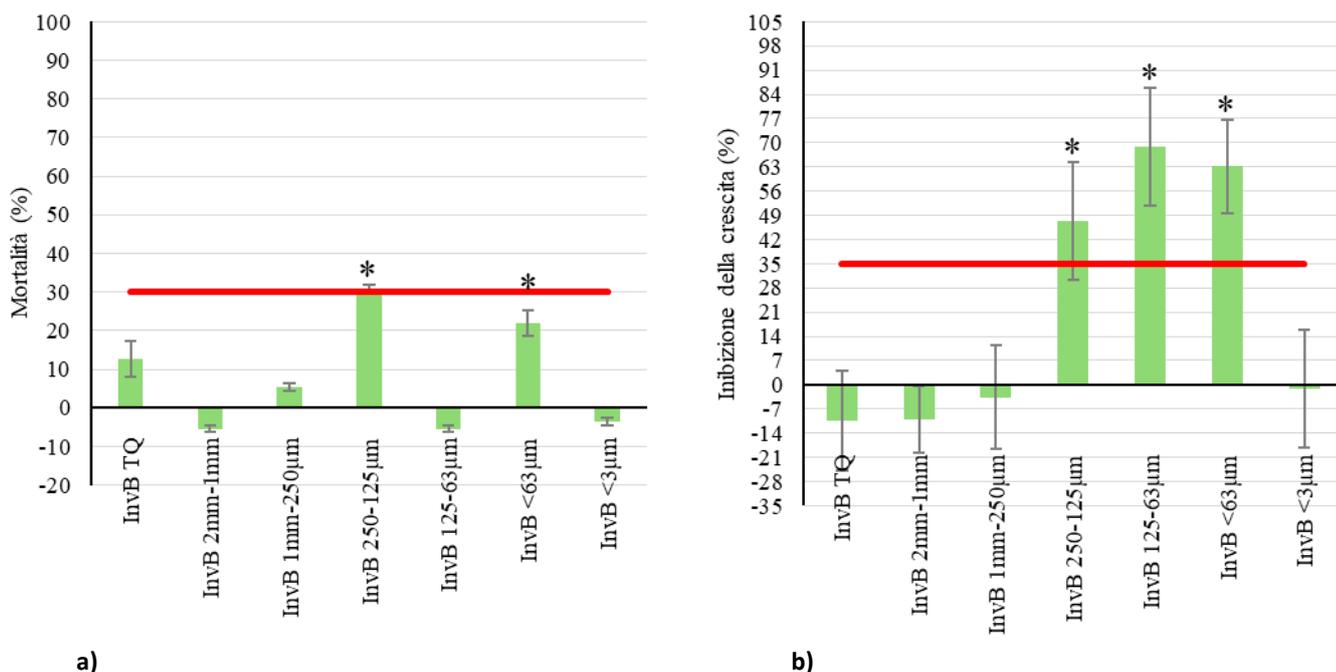
Figura 5. Composizione granulometrica, espressa come percentuale in peso sul totale secco dei sedimenti, di quattro invasi lombardi



**Figura 6.** Risultati del test con ostracodi applicato ai sedimenti dell'Invaso A (InvA), setacciati in diverse frazioni granulometriche (TQ = sedimento tal quale setacciato a 2 mm): a) mortalità (la linea rossa rappresenta la soglia del 30%); b) inibizione della crescita non corretta per la mortalità (la linea rossa rappresenta la soglia del 35%). Gli asterischi indicano le differenze significative rispetto al controllo (ANOVA seguito da test post-hoc di Dunnett,  $p < 0,05$ )

menti tal quali (TQ) dei due invasi A e B, setacciati a 2 mm come prevede il test, in cui prevale la frazione 1 mm – 250 µm (Figura 5), sono solo in parte paragonabili con i risultati ottenuti su questa frazione (Figure 6 e 7): non è quindi generalmente possibile prevedere l'esito del test sulla sola base della composizione granulometrica. Infatti, utilizzando tutti i dati accoppiati di analisi granulometriche ed ecotossicologiche

effettuati sui sedimenti degli invasi lombardi e i loro corpi idrici di valle nell'ambito delle collaborazioni tra CNR-IRSA e Regione Lombardia dal 2018 ad oggi (Figura 8), non si osserva una relazione tra la mortalità o inibizione della crescita e percentuale di sedimenti < 63 µm. Gli effetti maggiori si registrano dove i sedimenti fini risultano limitati, e sono probabilmente determinati da altre caratteristiche dei sedimenti,



**Figura 7.** Risultati del test con ostracodi applicato ai sedimenti dell'Invaso B (InvB), setacciati in diverse frazioni granulometriche (TQ = sedimento tal quale setacciato a 2 mm): **a)** mortalità (la linea rossa rappresenta la soglia del 30%); **b)** inibizione della crescita non corretta per la mortalità (la linea rossa rappresenta la soglia del 35%). Gli asterischi indicano le differenze significative rispetto al controllo (ANOVA seguito da test post-hoc di Dunnett,  $p < 0,05$ )

come la presenza di sostanze tossiche o la percentuale e qualità della sostanza organica presente. Da notare che, nella maggior parte dei casi (Figura 8), l'inibizione della crescita risulta sotto la soglia del 35% calcolata da Casado Martinez et al. (2016). Utilizzando lo stesso calcolo statistico (Eq. 3) sui nostri dati (61 campioni con mortalità < 20%), la soglia che ne deriva per questo endpoint è del 30%, in linea con quanto stimato dagli autori. Per la mortalità, la soglia è del 10%, confermando la scarsa influenza della granulometria sulla sopravvivenza degli organismi.

### 9. CONCLUSIONI

I test ecotossicologici costituiscono un punto di forza nelle analisi di rischio legate ai sedimenti (Heise et al., 2021). Tra le diverse applicazioni, offrono potenzialmente utile impiego nelle caratterizzazioni della tossicità dei sedimenti degli invasi, che necessitano di frequenti movimentazioni (fluitazioni e dragaggi) per il mantenimento della capacità utile di questi bacini. Tuttavia, almeno per quanto riguarda il test con ostracodi, restano alcuni aspetti da chiarire, relativi sia all'allestimento del saggio che all'interpretazione dei risultati. Gli esperimenti condotti dimostrano come il tipo di alimento algale fornito agli organismi incida sulla crescita: per questo, sarebbe auspicabile che nei rapporti di prova vengano sempre specificati la tipologia e la concentrazione dell'alimento utilizzato. Inoltre, confermano che la crescita degli organismi è parzialmente influenzata dalla presenza di sedimenti fini: è quindi utile porre attenzione durante l'allestimento e conduzione del test, per evitare risospensione delle frazioni limose e argillose che possano incrementare la torbidità della soluzione. Infine, è necessario considerare questa sensibilità anche nei risultati, per escludere la quota di risposta associata alla granulometria dei sedimenti, piuttosto che alla loro tossicità: i nostri risultati confermano che la variabilità legata potenzialmente alla granulometria copre almeno il 30% della risposta per l'inibizione della crescita e conferma quindi la soglia del 35% calcolata da Casado-Martinez et al. (2016).

### RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito dell' "Accordo di collaborazione Art. 15, L. 241/90 tra Regione Lombardia e Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque (CNR-IRSA) per l'implementazione di attività inerenti alla gestione delle acque superficiali e degli invasi", repertoriato da Regione Lombardia con RCC n.12981 del 4/03/2022.

Si ringraziano le dott.sse Clara Bravi (Regione Lombardia), Cristina Borlandelli e Erika Lorenzi (ARPA Lombardia).

### BIBLIOGRAFIA

APAT, 2004. Proposta di guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. Rapporto RTI CTN\_TES 1/2004, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici.

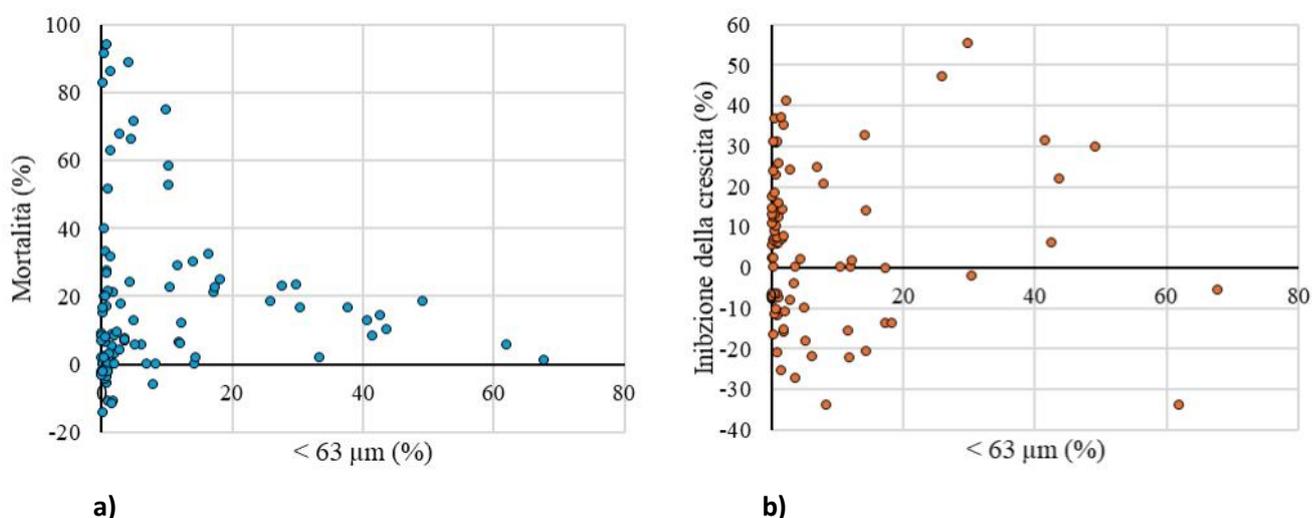
Casado-Martinez C., Burga-Pérez K.F., Bebon R., Ferrard J-F., Vermeirssen E.L.M., Werner I., 2016. The sediment-contact test using the ostracod *Heterocypris incongruens*: Effect of fine sediments and determination of toxicity thresholds. *Chemosphere* 151: 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.126>

CESI, 2005. Definizione di metodologie e indicatori per la valutazione della pericolosità dei sedimenti dei bacini idroelettrici. Rapporto CESI n. A5049897.

Chial B., Persoone G., 2002. Cyst-based toxicity tests XII. Development of a short chronic sediment toxicity test with the ostracod crustacean *Heterocypris incongruens*. Selection of test parameters. *Environ. Toxicol.* 17: 520-527. <https://doi.org/10.1002/tox.10085>

ISPRA, 2013. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne. I manuali di ecotossicologia. Manuali e Linee Guida 88/2013. Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA).

ISO 14371:2012. Water quality - Determination of



**Figura 8.** Relazione tra **a)** mortalità e **b)** inibizione della crescita degli ostracodi e percentuale di limo e argilla (< 63 μm) nei sedimenti prelevati da diversi invasi lombardi (n = 101 per la mortalità; n = 80 per l'inibizione della crescita, ossia campioni con mortalità < 30%). Le percentuali di frazioni < 63 μm sono calcolate in peso secco sul < 2 mm

fresh water sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). ISO 14371. ISO/TC 147/SC 5. 16 pp.

Heise S., M. Babut, C. Casado-Martinez, U. Feiler, B.J.D. Ferrari, L. Marziali, 2020. Ecotoxicological Testing of Sediments – threat or opportunity? *Journal of Soil and Sediments*, 20: 4218-4228. <http://dx.doi.org/10.1007/s11368-020-02798-7>

MacDonald D.D., Ingersoll C.G., Berger T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 20-31. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620190524>

Mariani L., Caracciolo A.M., Grenni P., 2020. Saggio con l'ostracode *Heterocypris incongruens*: applicazione per la valutazione ecotossicologica di terre e rocce da scavo trattate con agenti schiumogeni. *Notiziario dei metodi analiti & IRSA news*, volume 1 marzo 2020, CNR-IRSA. [https://www.irsa.cnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/notiz2020\\_1.pdf](https://www.irsa.cnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/notiz2020_1.pdf)

Marziali L., Guzzella L., Tartari G., Valsecchi L., Genoni P., Lorenzi E., Bravi C., 2017a. Protocollo per la valutazione della tossicità dei sedimenti degli invasi in Regione Lombardia ai fini della fluitazione. *Biologia Ambientale*, 31: 219-225

Marziali L., Tartari G., Salerno F., Valsecchi L., Bravi C., Lorenzi E., Genoni P., Guzzella L., 2017b. Climate Change Impacts on Sediment Quality of Subalpine Reservoirs: Implications on Management. *Water*, 9, 680. doi:10.3390/w9090680

# Test ecotossicologico con piante superiori: applicazione ai sedimenti degli invasi

a cura di

Laura Marziali (\*), Lucia Valsecchi, Beatrice Bastante, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Brugherio (MB).

## RIASSUNTO

Il test di contatto su sedimenti d'acqua dolce con piante superiori, eseguito con il kit Phytotoxkit F (protocolli UNICHIM N. 1651:2003 e ISO 18763:2016), è un saggio rapido e di semplice esecuzione che offre ottime potenzialità nella caratterizzazione del rischio legato a sedimenti contaminati. La valutazione viene effettuata sugli *endpoints* germinazione e allungamento radicale, che vengono combinati nell'indice di germinazione (Ig). Il test può essere eseguito sui sedimenti freschi, oppure essiccati e reidratati: i due approcci possono dare risultati diversi, perciò la scelta dipende dall'obiettivo del monitoraggio. Nel caso della valutazione della tossicità dei sedimenti degli invasi, è utile applicare il test ai sedimenti freschi. È consigliabile effettuare la valutazione dell'allungamento radicale misurando tutte le radici, piuttosto che solamente la più lunga. La soglia di tossicità per l'*endpoint* Ig potrebbe essere fissata al  $\pm 20\%$ .

## SUMMARY

The whole sediment contact test with higher plants, performed with the Phytotoxkit F kit (protocols UNICHIM No. 1651:2003 and ISO 18763:2016), is a rapid and simple test that offers excellent potential in environmental risk assessment linked to contaminated sediments. The evaluation is carried out considering two endpoints, i.e. germination and root growth, which are combined in the germination index (Ig). The test can be performed on wet sediments, or on dried and rehydrated sediment samples: the two approaches can give different results, so the choice depends on the monitoring objective. In the case of evaluating the toxicity of reservoir sediments, it is useful to apply the test to wet sediments. It is advisable to evaluate root growth by measuring all the roots, rather than just the longest. The toxicity threshold for the Ig could be set at  $\pm 20\%$ .

## 1. INTRODUZIONE

Il test di germinazione e allungamento radicale su piante superiori qui presentato è riferito all'utilizzo del kit Phytotoxkit F (Microbiotests Inc., Gent, Belgio), che comprende i semi della pianta monocotiledone *Sorghum saccharatum* (sorgo) e di due dicotiledoni, *Lepidium sativum* (crescione) e *Sinapis alba* (senape).

Il test si può applicare sia su matrice acquosa che solida e la procedura è conforme al Metodo UNICHIM N. 1651:2003 "Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo)" (UNICHIM, 2003) e alla norma ISO 18763:2016 "Soil quality – Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants" (ISO, 2016).

L'applicabilità ai sedimenti d'acqua dolce è indicata nel manuale ISPRA (2013) relativo alle batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne ed è confermata da diverse pubblicazioni scientifiche (Czerniawska-Kusza et al., 2006; Drobniwska et al., 2007; Wadhia e Thompson, 2007; Trojanowska, 2010; Baran e Tarnawski, 2011; Czerniawska-Kusza e Kusza, 2011; Sestinova et al., 2012). In particolare, questi lavori riportano casi di applicazione del kit su

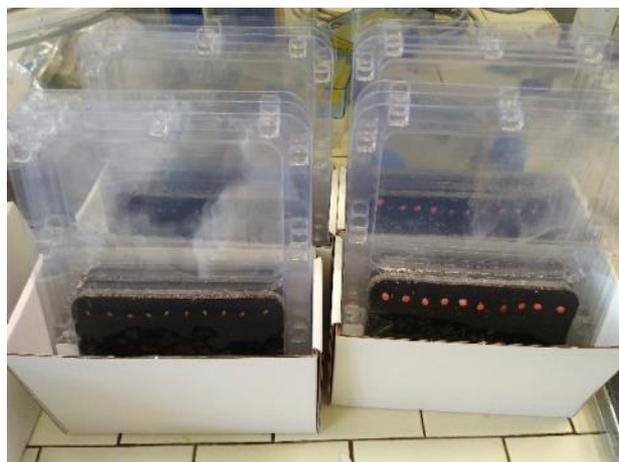
sedimenti e/o acqua interstiziale di invasi. Ad esempio, in Baran e Tarnawski (2011) e Czerniawska-Kusza e Kusza (2011) viene riportata una correlazione significativa tra l'indice di germinazione e la concentrazione di elementi in traccia nei sedimenti di alcuni invasi. Tra le tre piante utilizzate, il sorgo viene indicato come la specie più sensibile alla tossicità dei sedimenti, seguita generalmente dal crescione e, per ultima, dalla senape.

Per approfondire ulteriormente l'applicabilità del test ai sedimenti degli invasi, è stato effettuato questo studio, realizzato nell'ambito di un Accordo di collaborazione tra CNR-IRSA e Regione Lombardia, in collaborazione con l'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Lombardia (ARPA Lombardia), finalizzato alla messa a punto di un protocollo di caratterizzazione della tossicità dei sedimenti degli invasi lombardi, ai fini della fluitazione e di altre operazioni che possono determinare la movimentazione dei sedimenti dal bacino verso il corpo idrico di valle (Marziali et al., 2017a e 2017b).

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test di fitotossicità su sedimento permette di valutare due *endpoint*, la germinazione e l'allungamento radicale, a 72 ore, per tre specie di piante: sorgo, cre-

\* [laura.marziali@irsa.cnr.it](mailto:laura.marziali@irsa.cnr.it)



a)



b)

**Figura 1.** Test ecotossicologico con piante superiori: **a)** piastre trasparenti in cui vengono esposti i semi al sedimento; **b)** immagine ottenuta tramite scanner alla fine del test, sottoposta a elaborazione immagini mediante il software ImageJ per determinare la germinazione e l'allungamento radicale

scione e senape. I semi forniti nel kit vengono seminati su un suolo di riferimento e sui sedimenti da sottoporre a test in apposite piastre trasparenti (Fig. 1), che vengono poi incubate a  $25 \pm 2$  °C per 3 giorni al buio.

### 3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il saggio si applica a terreni, fanghi, sedimenti d'acqua dolce, eluati, acque interstiziali, acque dolci. Secondo il manuale ISPRA (2013), il kit si può applicare ai sedimenti tal quali, oppure essiccati e successivamente reidratati, all'acqua interstiziale e all'eluato: la scelta dipende dalla finalità del test (monitoraggio, dragaggi, balneazione, analisi di rischio, ecc.). Dati di letteratura mostrano che l'esposizione all'acqua interstiziale può dare effetti significativi sulla germinazione delle piante a causa della possibile presenza di ammoniaca, mentre l'allungamento radicale è l'endpoint più sensibile per i sedimenti tal quali, dove, in generale, le basse concentrazioni di inquinanti e la limitata biodisponibilità limitano la tossicità acuta (Baran e Tarnawski, 2011).

### 4. APPARECHIATURE

- 4.1 Setacciatore con setaccio con maglie da 2 mm, per ottenere la frazione di sedimento fresco passante al vaglio dei 2 mm, da utilizzare nel test;
- 4.2 Camera termostata o incubatore (temperatura  $25 \pm 2$  °C);
- 4.3 Scanner;
- 4.4 Computer con software di misurazione di immagini (ad esempio, il software open source ImageJ, <https://imagej.net/ij/>).

### 5. REAGENTI E MATERIALI

- 5.1 Semi di *S. saccharatum*, *L. sativum* e *S. alba*, reperibili in commercio;
- 5.2 Piastre trasparenti per la conduzione del test;
- 5.3 Filtri di carta;

- 5.4 Terreno di controllo;
- 5.5 Spatola per compattare e livellare il sedimento all'interno delle piastre;
- 5.6 Becker da 100 mL graduato, per misurare il volume dei sedimenti;
- 5.7 Siringa da 50 mL, per idratare il terreno;
- 5.8 Acqua deionizzata;
- 5.9 Bilancia tecnica;
- 5.10 Pinzette per posizionare i semi nelle piastre;
- 5.11 Raccoglitori per mantenere le piastre in posizione verticale durante il test.

### 6. PROCEDURA

La procedura del Phytotoxkit prevede di essiccare il sedimento all'aria, di setacciarlo a 2 mm e di porne 90 mL in un becker graduato. Qui, viene aggiunta gradualmente acqua deionizzata con una siringa, fino a determinare il volume necessario per saturare il terreno fino alla *Water Holding Capacity* (WHC), ossia la quantità di acqua che una matrice può trattenere senza rilasciare il liquido.

Per quanto riguarda il terreno di controllo, esso viene fornito essiccato e la WHC stimata è di 35 mL di acqua distillata per 90 mL di terreno.

Per allestire il test, 90 mL di sedimento o terreno di controllo essiccati e setacciati a 2 mm vengono posti ciascuno in una piastra trasparente (Fig. 1a) e reidratati con aggiunta della WHC precedentemente calcolata. Il materiale viene livellato con una spatola e coperto con un filtro di carta. Quando il filtro si è completamente imbevuto di acqua, si procede a posizionare 10 semi della stessa specie allineati su una fila parallela al margine superiore del filtro ed equidistanti tra loro (Fig. 1a). Ogni piastra viene quindi sigillata con il proprio coperchio trasparente e posizionata verticalmente in un raccoglitore.

Il test viene eseguito allestendo 3 repliche per il controllo e 3 repliche per ogni sedimento test, per ciascuna specie di pianta.

Le piastre vengono incubate a  $25 \pm 2$  °C al buio per tre giorni.

Alla fine del test, le piastre vengono scannerizzate e le immagini digitali (Fig. 1b) vengono analizzate per determinare il numero di semi germinati in ogni piastra e la lunghezza delle radici, mediante impiego del software di misurazione ImageJ.

La germinazione si calcola calcolando la percentuale di semi germinati (ossia quelli che presentano una radice lunga almeno 1 mm) rispetto al numero totale di semi esposti, e si esprime come inibizione.

L'inibizione dell'allungamento radicale ( $Inibizione_{AR}$ ), espressa in %, viene determinata come:

$$Inibizione_{AR} = \frac{AR_{controllo} - AR_{trattato}}{AR_{controllo}} \times 100$$

dove  $AR_{controllo}$  è la lunghezza media delle radici del controllo e  $AR_{trattato}$  è quella media del trattato.

I due endpoint si possono combinare nell'indice di germinazione (Ig), espresso come %, che si calcola come:

$$Ig = \frac{G_{trattato} \times AR_{trattato}}{G_{controllo} \times AR_{controllo}} \times 100$$

dove G = numero medio di semi germinati nel trattato o nel controllo e AR = lunghezza media delle radici (mm) nel trattato o nel controllo.

Nel protocollo viene specificato che l'allungamento radicale può essere determinato misurando la lunghezza di tutte le radici e calcolando quindi la media delle 3 repliche, oppure considerando solo la lunghezza della radice più lunga di ogni piastra (e quindi calcolando la media di questi 3 valori): i risultati dovrebbero essere analoghi.

I criteri di validità del test nel Phytotoxkit sono:

- la germinazione media nel controllo deve essere almeno il 70% per ciascuna pianta;
- la lunghezza media delle radici nel controllo deve essere almeno di 30 mm per ciascuna pianta (di 40 mm se si considera solo la radice più lunga di ciascuna piastra).

### 7. INTERFERENZE

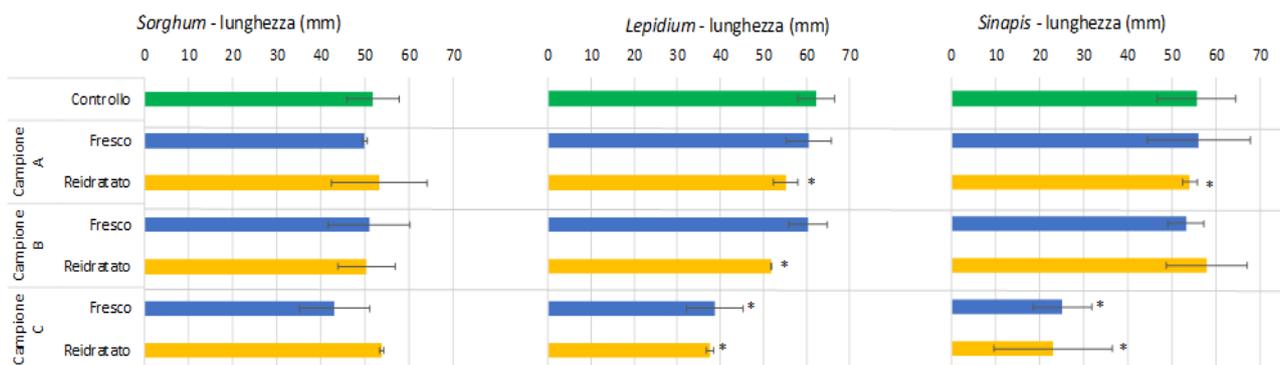
La procedura prevede di essiccare i sedimenti e successivamente di reidratarli fino al punto di WHC. Il livello di idratazione del substrato può influire significativamente sull'esito del test. Per questo, è necessario aggiungere esattamente lo stesso volume di acqua nelle 3 repliche del sedimento test o del controllo, per garantire risultati omogenei. Per garantire maggiore omogeneità tra repliche, è possibile pesare i sedimenti, piuttosto che misurarne il volume, prima di trasferirli nelle piastre. Inoltre, è necessario verificare che tutto il sedimento posizionato nella piastra sia omogeneamente reidratato e livellato, in modo che i 10 semi siano esposti alle stesse condizioni, riducendo la discrepanza nello sviluppo delle singole radici.

Va considerato che l'essiccazione e la successiva reidratazione dei sedimenti test possono alterare le proprietà del campione fresco ed incidere sulla valutazione della tossicità. In relazione all'obiettivo finale del monitoraggio, è quindi necessario valutare se eseguire il saggio sui sedimenti reidratati, oppure direttamente sui sedimenti freschi setacciati a 2 mm. In quest'ultimo caso, generalmente, non sarà necessario aggiungere acqua, dal momento che i sedimenti sono già saturi. Nella maggior parte dei casi, sarà invece necessario rimuovere l'eccesso di acqua, che comunque tenderà ad essere eliminato una volta che le piastre saranno posizionate in verticale nei raccoglitori.

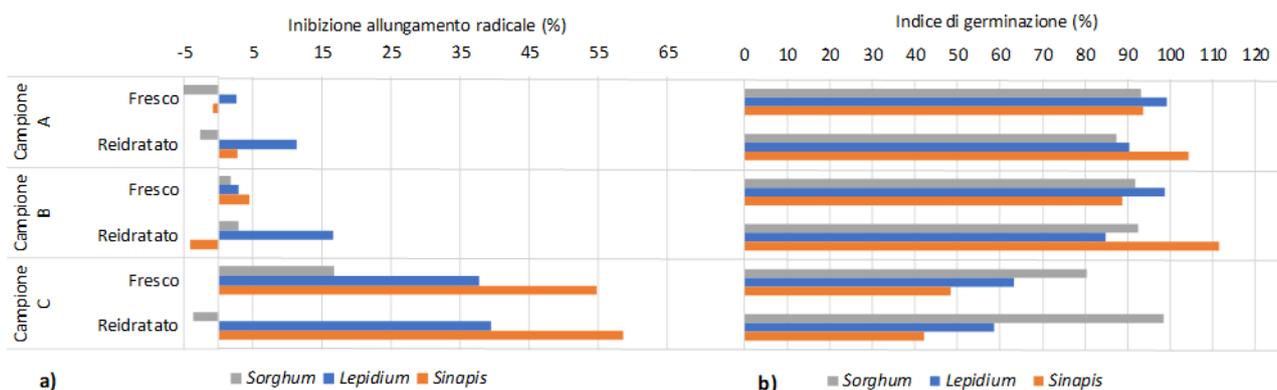
Infine, va considerato che il calcolo dell'inibizione dell'allungamento radicale, calcolato utilizzando la media di tutte le radici, piuttosto che utilizzando la media delle tre radici più lunghe (una per replica), potrebbe determinare risultati non sempre confrontabili.

### 8. APPLICAZIONE AI SEDIMENTI DEGLI INVASI LOMBARDI

Allo scopo di valutare l'efficacia del test nella valutazione della tossicità dei sedimenti accumulati nei bacini idroelettrici, si è ritenuto utile testare il kit su sedimenti freschi prelevati in diversi invasi lombardi e di confrontare i risultati con quelli ottenuti testando gli stessi campioni di sedimenti dopo essiccazione e



**Figura 2.** Test ecotossicologico con piante superiori su sedimenti prelevati in un invaso lombardo: confronto tra esiti del test effettuato sul campione fresco (colonne blu) e sul campione secco e reidratato (colonne gialle). L'endpoint considerato è la lunghezza delle radici. Le colonne rappresentano la media, le barre  $\pm$  deviazione standard. Gli asterischi mostrano una differenza significativa rispetto al controllo (colonne verdi) (ANOVA a una via, post-hoc di Bonferroni,  $p < 0.05$ )



**Figura 3.** Test ecotossicologico con piante superiori su sedimenti prelevati in un vaso lombardo: confronto tra esiti del test effettuato con campione fresco e con campione secco e reidratato per: **a)** inibizione dell’allungamento radicale; **b)** indice di germinazione. Le colonne rappresentano la media.

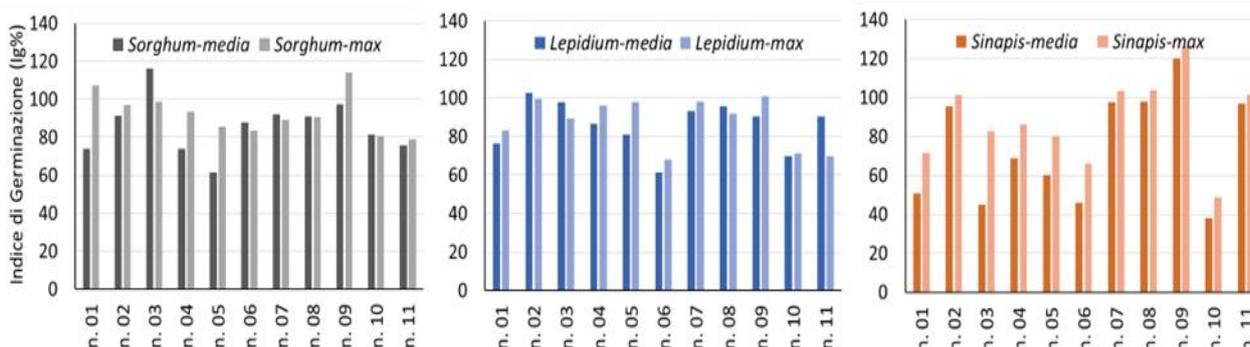
reidratazione: un esempio è riportato in Figura 2. Considerando il numero di semi germinati, non sono emerse differenze significative. Per quanto riguarda l’allungamento radicale, invece, non sempre i sedimenti freschi e secchi hanno dato lo stesso risultato: nel caso del *Lepidium*, i campioni A e B freschi sono risultati in linea con il controllo, mentre gli stessi campioni, reidratati, mostrano una inibizione significativa. I risultati, convertiti in inibizione dell’allungamento radicale (Fig. 3a) o in indice di germinazione (Fig. 3b), confermano queste differenze tra sedimenti freschi e reidratati.

Secondo Czerniawska-Kusza e Kusza (2011), i sedimenti essiccati e reidratati tenderebbero a dare biostimolazione, in quanto il maggiore accumulo di nutrienti sulla parte solida dei sedimenti e la ridotta biodisponibilità dei contaminanti (es. dei metalli) potrebbero favorire la crescita delle piante; al contrario, il test applicato agli stessi sedimenti tal quali potrebbe mostrare effetti più marcati sulle piante, anche di inibizione, probabilmente perché il pH leggermente acido potrebbe favorire la biodisponibilità delle sostanze tossiche. I nostri risultati non sembrano confermare queste ipotesi, ma evidenziano una certa differenza nella risposta ai sedimenti freschi rispetto a quelli reidratati.

Nel protocollo Phytotoxkit non vengono indicate soglie di tossicità per gli endpoints. In Sestinova et al. (2012) viene riportata come soglia di effetto una percentuale di Ig < 90% (per l’inibizione) o > 110% (per la biostimolazione). Anche la biostimolazione, infatti,

risulta una risposta piuttosto comune per le piante alla presenza di sostanze tossiche e viene perciò considerata come effetto significativo. Viene però specificato che il criterio di validità del test è una germinazione nel controllo di almeno il 90% dei semi, mentre nel Phytotoxkit viene indicata una percentuale minima di germinazione nel controllo  $\geq 70\%$ . Di conseguenza, le soglie di tossicità dovrebbero essere più “permissive” rispetto a quelle indicate in letteratura. Dai test eseguiti sui sedimenti degli invasi emerge che la differenza significativa rispetto al controllo per l’endpoint Ig si ottiene per percentuali di effetto non inferiori al 20% (test ANOVA a una via, post-hoc di Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Pertanto, per l’indice di germinazione, potrebbe essere considerata una soglia di tossicità del  $\pm 20\%$ .

Per quanto riguarda l’endpoint allungamento radicale, con i dati disponibili è stato effettuato il confronto tra la valutazione dell’endpoint mediante calcolo della lunghezza media delle radici rispetto al calcolo utilizzando solamente la misura della radice più lunga di ogni piastra. Ad esempio, per l’invaso A (Fig. 4), i risultati ottenuti per il sorgo e il crescione sono generalmente paragonabili (test del chi-quadrato,  $p > 0,05$ ), mentre per la senape le differenze sono significative ( $p < 0,05$ ), in quanto i valori ottenuti considerando la radice più lunga sono generalmente più elevati rispetto a quelli calcolati sulle medie. Non sempre questo si traduce in un diverso giudizio di tossicità, ma, in questi casi, si ritiene che la valutazione considerando i valori medi possa essere maggiormente rappresenta-



**Figura 4.** Indice di germinazione calcolato per le tre piante esposte ai sedimenti dell’invaso, considerando la lunghezza media delle radici (media) e quella massima per ogni piastra (max)

tiva, oltre che più cautelativa, rispetto a quella che prende in considerazione solo le radici più lunghe.

## 9. CONCLUSIONI

I test ecotossicologici di contatto standardizzati per sedimenti d'acqua dolce sono relativamente pochi. Tra questi, il test con piante superiori è un saggio rapido e di facile esecuzione, che permette di acquisire informazioni utili nelle analisi di rischio ambientale legate a sedimenti contaminati. Tra le diverse applicazioni, il test può essere impiegato nelle caratterizzazioni della tossicità dei sedimenti degli invasi, ai fini della fluitazione. In questi casi, può essere eseguito direttamente sui sedimenti freschi, per un maggior realismo ecologico, semplificando così anche la preparativa. Il kit Phytotoxkit permette di velocizzare la lettura dei risultati, grazie alla possibilità di digitalizzare le immagini dell'apparato radicale e di effettuare le misurazioni anche a posteriori.

## RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito dell' "Accordo di collaborazione Art. 15, L. 241/90 tra Regione Lombardia e Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque (CNR-IRSA) per l'implementazione di attività inerenti alla gestione delle acque superficiali e degli invasi", repertoriato da Regione Lombardia con RCC n. 12514 del 20/02/2020. Si ringraziano le Dott.sse Clara Bravi (Regione Lombardia), Cristina Borlandelli e Erika Lorenzi (ARPA Lombardia).

## BIBLIOGRAFIA

- Baran A., Tarnawski M., 2011. Phytotoxkit/Phytotestkit and Microtox® as tools for toxicity assessment of sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98: 19-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.010>
- Czerniawska-Kusza I., Ciesielczuk T., Kusza G., Cichon A., 2006. Comparison of the phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments. *Environ. Toxicol.*, 21: 367-372. <https://doi.org/10.1002/tox.20189>
- Czerniawska-Kusza I., Kusza G., 2011. The potential of the phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. *Environ. Monit. Assess.*, 179: 113-121. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1722-y>
- Drobniewska A., Sumorok B., Nalecz-Jawecki G., Sawicki J., 2007. Toxicity assessment of sediments and soil from rivers and floodplains in Central Poland using a battery of microbiotests – A case study. *Frese-nius Environmental Bulletin*, 2: 109.
- ISO, 2016. Soil quality. Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants. ISO 18763:2016.
- ISPRA, 2013. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne. I manuali di ecotossicologia. Manuali e Linee Guida 88/2013. Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA).
- Marziali L., Guzzella L., Tartari G., Valsecchi L., Genoni P., Lorenzi E., Bravi C., 2017a. Protocollo per la valutazione della tossicità dei sedimenti degli invasi in Regione Lombardia ai fini della fluitazione. *Biologia Ambientale*, 31: 219-225.
- Marziali L., Tartari G., Salerno F., Valsecchi L., Bravi C., Lorenzi E., Genoni P., Guzzella L., 2017b. Climate Change Impacts on Sediment Quality of Subalpine Reservoirs: Implications on Management. *Water*, 9, 680. <https://doi.org/10.3390/w9090680>
- Sestinova O., Findorakova L., Hanculak J., 2012. Toxicity testing of sediments. *Nova Biotechnologia et Chimica*, 11: 111-116.
- Trojanowska A., 2010. Application of Phytotoxkit microbiotest for hazard assessment of bottom sediments in the eutrophic dam reservoir. *Limnological Review*, 10: 173-180. <https://doi.org/10.2478/v10194-011-0020-6>
- UNICHIM, 2003. Qualità dell'acqua – Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo) (Saggio di tossicità cronica breve). MU N. 1651, Edizione 2003.
- Wadhia K., Thompson K. C., 2007. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry*, 26: 300-307. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.011>

# Temperatura e ossigeno disciolto nelle acque lacustri: metodi di misura e applicazioni, con particolare riferimento alle acque profonde

a cura di

*Gabriele Tartari (\*), Paola Giacomotti, Rosario Mosello, Arianna Orru', Michela Rogora, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Verbania.*

## RIASSUNTO

L'ossigeno disciolto è un parametro fondamentale per la definizione dello stato qualitativo delle acque superficiali. I cambiamenti climatici si sono dimostrati un fattore che può fortemente influenzare la concentrazione dell'ossigeno disciolto nelle acque e le sue variazioni, in particolare le concentrazioni negli strati profondi dei laghi. La misura dell'ossigeno quindi, associata a quella della temperatura delle acque, deve essere condotta con metodi affidabili e confrontabili nel tempo, in particolare negli studi sull'evoluzione a lungo termine degli ecosistemi lacustri. In questo articolo vengono descritte le principali metodiche utilizzate per la misura della temperatura e dell'ossigeno disciolto lungo la colonna d'acqua lacustre, focalizzandosi sui vantaggi e svantaggi di alcune metodiche in uso per la determinazione dell'ossigeno disciolto. Vengono presentati alcuni esempi di dati relativi al caso di studio del Lago Maggiore, per il quale il CNR-IRSA di Verbania monitora da diversi decenni i valori di temperatura e ossigeno nel contesto di programmi di ricerca nazionali e internazionali.

## SUMMARY

Dissolved oxygen is of great importance in aquatic environments and contributes to define their qualitative and ecological status. Climate change proved to be an important factor influencing dissolved oxygen levels and distribution in lakes, particularly in deep waters. Consequently, dissolved oxygen, as well as water temperature, need to be quantified with reliable and comparable methods, especially when dealing with long-term studies on the evolution of aquatic ecosystems. In this paper, we present and discuss the main methodologies for dissolved oxygen and water temperature measurements in lakes, focusing on advantages and disadvantages of some commonly used methods for dissolved oxygen. We present data from a case study i.e. Lake Maggiore, a deep subalpine lake, which has been monitored by CNR-IRSA since several decades in the context of national and international research programs.

## 1. INTRODUZIONE

L'ossigeno disciolto rappresenta un parametro fondamentale per tutte le forme di vita acquatica, oltre ad essere coinvolto in importanti processi che regolano i cicli biogeochimici degli elementi. Negli ecosistemi d'acqua dolce, la presenza di ossigeno deriva sostanzialmente dallo scambio con l'atmosfera e dai processi biologici operati dagli organismi acquatici, in particolare la fotosintesi e la respirazione. Tale parametro viene, come noto, influenzato da altri parametri abiotici quali ad esempio la temperatura.

L'ossigeno disciolto nelle acque può essere espresso come concentrazione, ovvero milligrammi di ossigeno in 1 L d'acqua (mg/L) o come percentuale rispetto alla saturazione, ovvero la quantità di ossigeno presente rispetto al valore massimo, preso uguale a cento, che si può avere nelle stesse condizioni di salinità, di temperatura e pressione atmosferica; per questo calcolo è indispensabile la misura della temperatura dell'acqua al momento del prelievo. Valori superiori a 100% (sovrasaturazione) si possono misurare, ad esempio, nelle acque superficiali dei laghi nel periodo estivo, quando è elevata la produttività algale. Bassi valori di ossigeno si possono invece rilevare in presenza di un elevato carico organico che comporta un

consumo di ossigeno per la degradazione della sostanza organica. Basse concentrazioni (ipossia) o totale assenza di ossigeno (anossia) possono anche caratterizzare le acque profonde dei laghi eutrofici a causa della sedimentazione e successiva degradazione della sostanza organica: in queste condizioni la carenza di ossigeno favorisce il rilascio di fosforo dai sedimenti (carico interno del lago) e la produzione di sostanze ridotte quali ammonio, metano, idrogeno solforato. Questi processi indicano come l'ossigeno sia un parametro fondamentale per la definizione dello stato qualitativo delle acque superficiali: il suo valore, espresso come percentuale di saturazione, concorre ad esempio al calcolo del LIMECO, indice sintetico introdotto dal D.M. 260/2010 per la determinazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua. L'ossigeno viene inoltre considerato, unitamente a fosfato totale e trasparenza, nel calcolo dell'indice LTLecco (Livello Trofico dei laghi per lo stato ecologico), in cui nello specifico si considera il valore ipolimnico nel periodo di massima stratificazione.

I cambiamenti climatici si sono dimostrati un fattore che può fortemente influenzare la presenza e le variazioni dell'ossigeno disciolto nei laghi. In particolare, sempre più studi documentano come il riscaldamento

\* [gabriele.tartari@cnr.it](mailto:gabriele.tartari@cnr.it)

delle acque e le variazioni nell'idrodinamica lacustre comportino effetti negativi sull'ossigenazione delle acque. Nei laghi profondi, anche in assenza di problemi di eutrofizzazione, una circolazione tardo-invernale limitata come profondità e meno frequente determina l'isolamento degli strati profondi che progressivamente si impoveriscono in ossigeno. Questo fenomeno è stato descritto e documentato nei laghi profondi subalpini del Nord Italia (Rogora et al., 2018) così come in numerosi bacini lacustri in diverse parti del mondo (Jane et al., 2021; Jansen et al., 2024). A peggiorare questa situazione concorre anche il riscaldamento delle acque immissarie, la cui profondità di intrusione diminuisce, con un conseguente minore effetto ossigenante sugli strati profondi (Dresti et al., 2022). Anche in laghi meno profondi, in cui il mescolamento completo della colonna d'acqua si verifica regolarmente, a causa del riscaldamento delle acque, si assiste ad un'estensione del periodo di stratificazione estiva e di conseguenza dell'anossia di fondo, in alcuni casi con effetto sul rilascio complessivo di fosforo dai sedimenti (Jane et al., 2023). Lo studio di questi fenomeni richiede, accanto alla quantificazione dell'ossigeno disciolto, anche un'affidabile e accurata misura della temperatura delle acque, indispensabile per lo studio dell'idrodinamica lacustre e necessaria al calcolo della percentuale di saturazione dell'ossigeno.

Nei paragrafi seguenti vengono descritte le principali metodiche utilizzate per la misura della temperatura e dell'ossigeno disciolto nelle acque dolci, con particolare riferimento agli strati profondi dei laghi, per i quali queste misure sono di primaria importanza per la valutazione degli effetti del riscaldamento climatico sulla termica, l'idrodinamica e più in generale sulla qualità delle acque. Vengono inoltre presentati dei riferimenti al caso specifico del Lago Maggiore, per il quale il CNR-IRSA di Verbania monitora da diversi decenni i valori di temperatura e ossigeno nel contesto di programmi di ricerca nazionali e internazionali.

## 2. METODICHE PER LA MISURA DELLA TEMPERATURA E DELL'OSSIGENO DISCIOLTO NELLE ACQUE PROFONDE DEI LAGHI

La misura della temperatura nelle acque profonde, sia in ambienti marini che di acqua dolce, dall'inizio del secolo scorso è stata generalmente eseguita con termometri al mercurio a rovesciamento (Fig. 1a), prodotti inizialmente dalla ditta Negretti & Zambra di Londra (Negretti & Zambra, 1873): i termometri erano realizzati in modo tale che, quando capovolti, si provoca il distacco nel capillare dal mercurio contenuto nel bulbo, andando così a memorizzare la temperatura all'atto del rovesciamento. Questi termometri, certificati per l'uso in oceanografia, avevano generalmente una suddivisione in 0,1 o 0,05 gradi Celsius (Farrel, 1966). Per la misura della temperatura in acque superficiali si utilizzavano, invece, termometri a mercurio con pozzetto, generalmente graduati in decimi di grado (APAT IRSA-CNR, 2003a).

La misura della profondità a cui avviene il prelievo dei campioni, e l'eventuale misura della temperatura con termometri a rovesciamento, viene in genere riferita alla lunghezza di cavo, derivata dai contimetri dell'ar-

gano, con l'eventuale correzione per l'inclinazione del cavo stesso. Le incertezze di misura possono però essere anche di alcuni metri, a causa della deriva del cavo rispetto all'imbarcazione durante il campionamento.

Per le misure della temperatura in acque poco profonde, dalla metà del secolo scorso si sono utilizzati anche i termistori (resistenze elettriche capaci di reagire al cambiamento di temperatura nell'ambiente da monitorare). Questi ultimi erano però limitati dalla lunghezza del cavo di connessione tra l'elemento sensibile alla temperatura e l'alimentatore, costituito da un ponte di Wheatstone che permetteva di determinare la temperatura. A partire dal 2009, al fine di impedire l'inquinamento ambientale da mercurio, è entrato in vigore un Decreto Ministeriale in recepimento della direttiva 2007/51/CE che vieta di produrre e utilizzare termometri e altri apparecchi di misurazione che contengano mercurio. Questo provvedimento ha gradualmente portato all'utilizzo sempre più diffuso dei termistori a termoresistenza al platino (Pt100 e Pt1000), internamente alimentati a batteria, con risoluzione anche inferiore a 0,001 °C e velocità di risposta molto elevata (50-200 ms). Come conseguenza, per le misure negli ambienti acquatici si è passati all'utilizzo di sonde multiparametriche alimentate internamente, dotate di memoria per registrare i valori acquisiti dai vari sensori, quali quello dedicato alla misura della profondità, anch'esso di elevata precisione (risoluzione di alcuni centimetri). Le misure lungo la colonna d'acqua di temperatura e di altri parametri (ossigeno disciolto, pH, conducibilità elettrica, potenziale redox, ecc.) hanno così permesso di descrivere in dettaglio i profili verticali di questi parametri.

Al CNR-IRSA di Verbania, in affiancamento ai termometri a rovesciamento, dal 2006 è stata utilizzata una sonda multiparametrica CTD 316 Ocean Seven (Idronaut). L'abbandono definitivo dei termometri a rovesciamento è avvenuto da gennaio 2016 con l'utilizzo di una sonda multiparametrica CTD 304 Plus Ocean Seven (Idronaut) con sensori di profondità, temperatura e conducibilità elettrica, alla quale è stata poi affiancata nel 2022 una sonda CTD 310 Ocean Seven (Idronaut) dotata anche di sensore ottico a fluorescenza dell'ossigeno disciolto (Fig. 1c, d). Queste sonde per la misura della temperatura hanno risoluzione di 0,0001 °C e accuratezza 0,0015 °C, possono acquisire dati dai sensori con frequenze fino a 50 ms (20 dati al secondo). Tali dati vengono successivamente elaborati, ad esempio integrando al valore di ogni metro con il software Idronaut REDAS-5.

La determinazione dell'ossigeno disciolto basata sulla titolazione iodometrica secondo Winkler (1888), utilizzata in molte linee guida (ISO 5813:1983; EN 25813:1992; ASTM D888. 2018, ASTM D6764-02. 2019), è rimasta sostanzialmente invariata negli anni ad esclusione della modifica all'azide (A.P.H.A., 1955) introdotta per ridurre le interferenze da sostanze riducenti (nitriti o ferro bivalente), variazione di poca rilevanza per le acque dei laghi subalpini in quanto queste sostanze riducenti sono in genere presenti in quantità trascurabili (APAT IRSA-CNR 2003b).

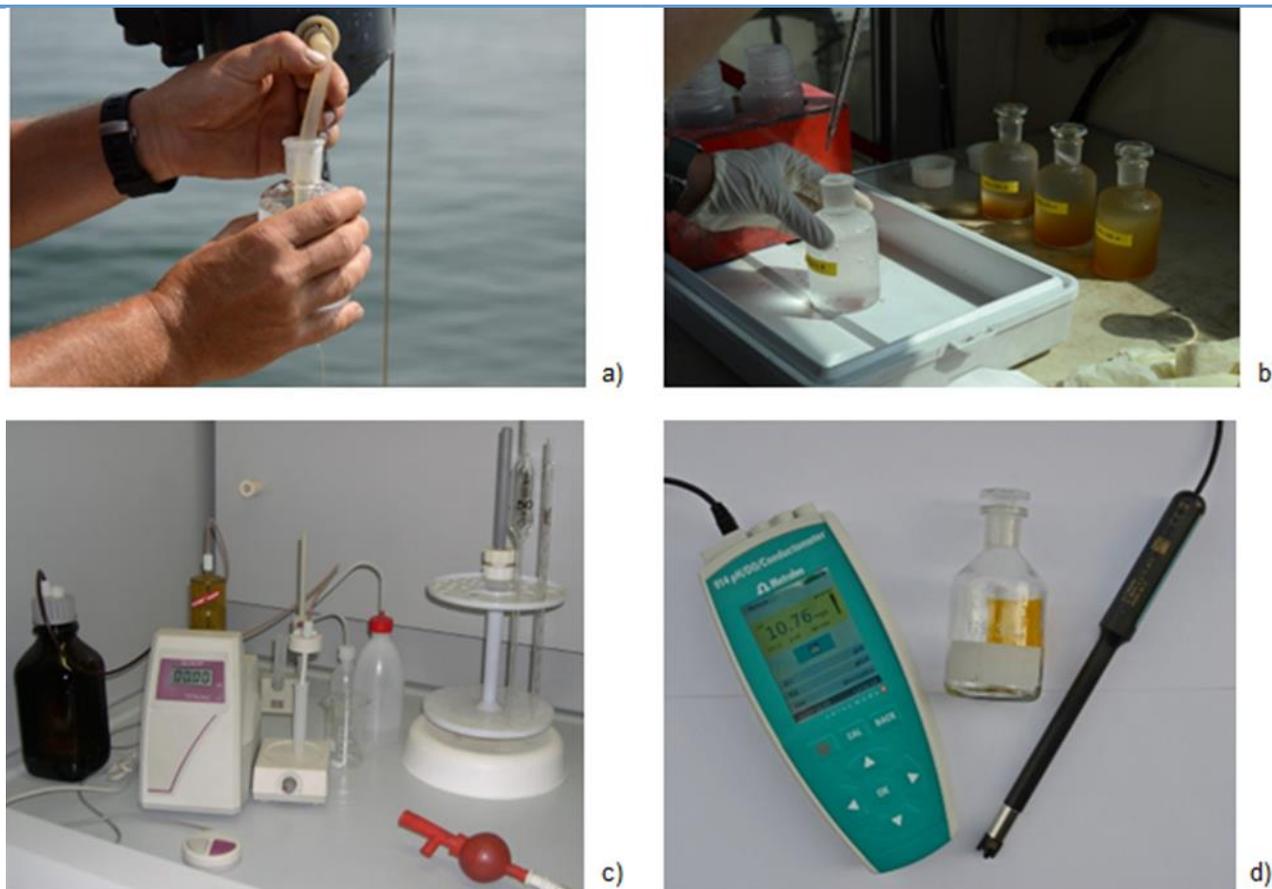
Il metodo di Winkler è una titolazione volumetrica



**Figura 1.** Misura della temperatura delle acque del Lago Maggiore: a) Termometro a rovesciamento con custodia in legno; b) Termometro a rovesciamento montato sulla bottiglia Niskin di campionamento; c) Sonda multiparametrica Idronaut CTD 304 Plus; d) Sonda multiparametrica Idronaut CTD 310; e) Campionamento con sonde Idronaut CTD 304 e 310; f) Contametri per il controllo del cavo di campionamento

basata sull'ossidazione dell'idrossido di manganese (II) a stati di valenza superiori da parte dell'ossigeno disciolto nel campione; la reazione avviene in ambiente alcalino. Con la successiva acidificazione eseguita in laboratorio, in presenza di ioduro il manganese si riduce a Mn (II), liberando iodio in quantità equivalente all'ossigeno inizialmente disciolto nel campione. Lo

iodio liberato viene titolato con sodio tiosolfato in presenza di thiodene o salda d'amido come indicatore del viraggio. Il campione viene prelevato sul campo alla profondità desiderata mediante bottiglia Niskin o similare (Fig. 1b), trasferito, facendo attenzione a non ossigenarlo con l'aria, in una bottiglia di vetro con tappo smerigliato a becco di flauto o a punta arroton-



**Figura 2.** Determinazione dell'ossigeno disciolto sui campioni del Lago Maggiore: a) campionamento mediante bottiglie in vetro con tappo smerigliato a becco di flauto; b) fissaggio dei campioni per la successiva titolazione in laboratorio; c) buretta digitale per la titolazione secondo il metodo di Winkler; d) Terminale *Metrohm 914* per la misura dell'ossigeno disciolto con l'elettrodo O2-Lumitrode ottico a fluorescenza e bottiglia di prelievo in vetro

data e immediatamente fissato con i reagenti cloruro di manganese II e ioduro - sodio azide (Fig. 2a, b). Dopo l'agitazione il precipitato così formatosi si conserva per circa 48 ore. L'analisi in laboratorio prevede la solubilizzazione del precipitato con acido cloridrico con il corrispondente rilascio di iodio  $I_2$ , un volume noto (50 mL) viene prelevato e immediatamente titolato con sodio tiosolfato (0,01 N) fino a colorazione giallo paglierino prima, poi al blu dopo l'aggiunta dell'indicatore, fino al viraggio finale all'incolore (Fig. 2c).

In alternativa al metodo di Winkler, dalla fine degli anni 1960 si è iniziato ad eseguire misure in campo di ossigeno disciolto con elettrodi elettrochimici basati sul principio polarografico (Clark et al., 1953), che richiedono però una regolare manutenzione con la sostituzione della membrana con l'elettrolita e la successiva calibrazione (ISO 5814 2012; ASTM D6764-02 2019); tali elettrodi per molti anni sono stati utilizzati nelle sonde multiparametriche. Più recentemente agli elettrodi polarografici si sono affiancati i sensori ottici che si basano sul principio dell'estinzione della fluorescenza o luminescenza (ISO 17289 2014). La membrana sensibile all'ossigeno disciolto situata nel cappuccio del sensore incorpora una sostanza fluorescente (luminoforo), che viene eccitata dalla luce emessa da un diodo emettitore (LED) a una lunghezza d'onda specifica: l'energia viene subito rilasciata per tornare allo stato fondamentale con emissione di fluorescenza. In presenza di ossigeno in contatto con

il substrato fluorescente, la transizione allo stato fondamentale avviene senza emissione di radiazioni e il contenuto di ossigeno disciolto può così essere determinato in base all'intensità della fluorescenza o alla sua durata, misurata da un fotorilevatore che converte l'emissione luminosa in un segnale elettrico. Per il calcolo del contenuto di ossigeno disciolto si usa l'equazione di Stern-Volmer che descrive il processo di smorzamento della fluorescenza (Gschwind, 2020).

Dal 2022 al CNR-IRSA di Verbania, in parallelo alla determinazione puntuale iodometrica di Winkler eseguita in laboratorio, è stata introdotta anche la misura con l'elettrodo *Metrohm O2-Lumitrode* ottico a fluorescenza per la misura dell'ossigeno collegato allo strumento *Metrohm 914 pH/DO/Cond* (Fig. 2d).

La percentuale di ossigeno disciolto viene invece calcolata sulla base degli equilibri chimico fisici di dissoluzione dell'ossigeno tenendo conto della temperatura dell'acqua e della quota altitudinale della superficie del corpo idrico. Nel caso di misure in acque marine o salmastre, con un elevato contenuto di sali disciolti, è necessario tener conto anche della salinità. La percentuale di saturazione può essere velocemente ricavata da tabelle di conversione che riportano la solubilità dell'ossigeno al variare della temperatura dell'acqua (APAT IRSA-CNR, 2003b) oppure calcolata seguendo approcci chimico fisici. Presso il CNR-IRSA di Verbania è utilizzata la formula proposta da Mortimer (1981) da cui si ricava la percentuale di saturazione così calcolata:

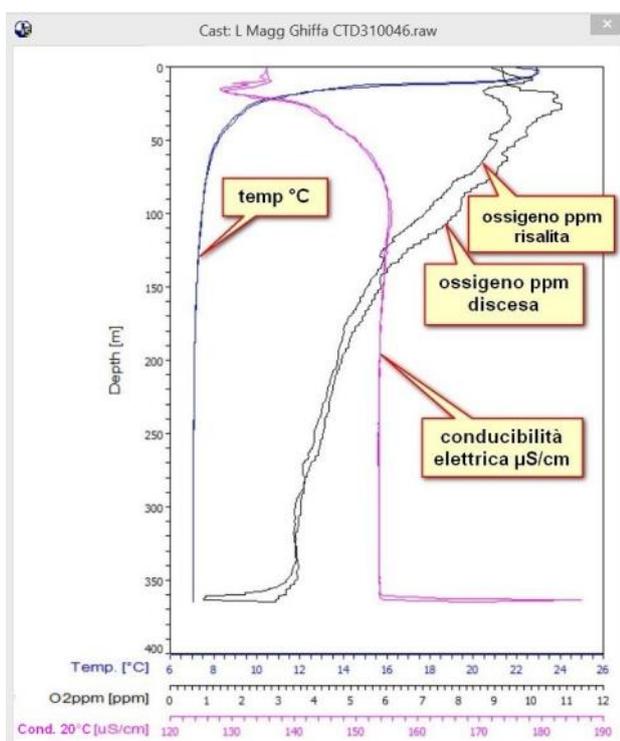
$$\% \text{ saturazione} = 100 \left( \text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \right) e^{-\left(7,7117 - 1,31403 \ln(t) + 45,93\right) + 5,25 \ln(1-(h) / 44,3)}$$

dove t è la temperatura (°C) dell'acqua alla profondità di misura e h è la quota espressa in km.

### 3. CASO DI STUDIO: IL LAGO MAGGIORE

Il Lago Maggiore è un lago profondo subalpino (superficie 212,5 km<sup>2</sup>, profondità massima 370 m, volume 38,1 km<sup>3</sup>) che viene monitorato mensilmente nell'ambito delle ricerche a lungo termine promosse dalla Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere (CIP AIS; CNR IRSA, 2024; <https://www.cipais.org/>). La disponibilità di serie pluridecennali di dati ha portato all'inclusione del Lago Maggiore nella Rete per la Ricerca Ecologica a Lungo Termine, sia italiana che europea (LTER; <https://www.lteritalia.it>; <https://elter-ri.eu/>), nonché in network collaborativi di ricerca come GLEON (Global Lake Observatory Network; <https://gleon.org/>).

Temperatura e ossigeno vengono rilevati lungo la colonna d'acqua del Lago Maggiore dagli anni '50 del secolo scorso, e in modo regolare e continuativo dal 1988. Allo scopo di valutare la confrontabilità dei dati ottenuti con diversi strumenti e metodologie, sono state utilizzate le due sonde multiparametriche CTD 310 e 304 Plus Ocean Seven (Idronaut) in modo accoppiato, ovvero montate in parallelo sul cavo utilizzato per i prelievi in profondità dei campioni di acqua del Lago Maggiore (Fig. 1e). Sono stati qui riportati, a titolo di esempio, i profili mensili eseguiti sul Lago



**Figura 3.** Esempio di un profilo della colonna d'acqua del Lago Maggiore eseguito il 27/8/2024 ottenuto con la sonda multiparametrica CTD 310 Ocean Seven (Idronaut) ed elaborato con il software Idronaut REDAS-5. Per la temperatura e la conducibilità elettrica i profili in discesa e risalita si sovrappongono perfettamente, mentre per l'ossigeno si nota una evidente differenza

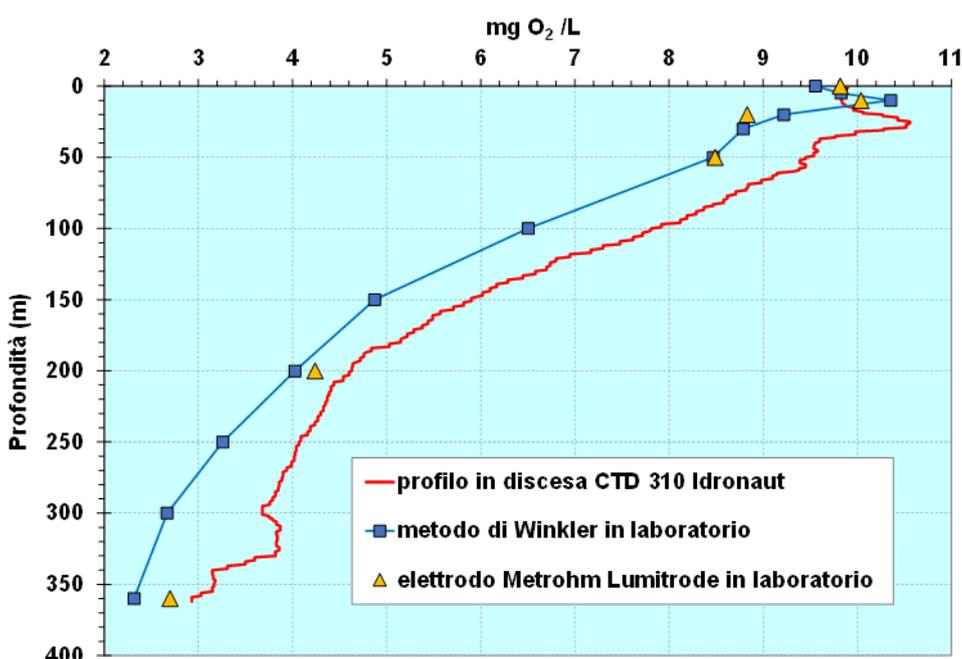
Maggiore, nella stazione di massima profondità, situata di fronte al Comune di Ghiffa, da gennaio 2023 a gennaio 2025, per un totale di 25 profili da 0 a 360 metri (CIP AIS; CNR IRSA 2024). Le sonde sono state programmate per acquisire i dati alla frequenza di 200 ms (5 dati al secondo), dopo un condizionamento per immersione in superficie per 3-5 minuti. Dai profili acquisiti con le sonde sono stati estrapolati i valori di temperatura e ossigeno disciolto ad intervalli di 1 m (360-365 valori), integrando con il software Idronaut REDAS-5 i 1500-2000 valori acquisiti in discesa dalle sonde (Fig. 3).

La sonda CTD 310, dotata di sensore ottico per l'ossigeno disciolto, è stata utilizzata da gennaio 2023 a aprile 2023 con un cappuccio sensore per l'ossigeno avente velocità di risposta 3 secondi (azoto - aria). Il cappuccio è stato sostituito e ricalibrato con quello con velocità di risposta 1 secondo ad aprile 2023 e giugno 2024 e ricalibrato a agosto 2024. Entrambe le sonde sono state inviate alla ditta costruttrice Idronaut per la calibrazione di tutti sensori in aprile 2023. Per la temperatura si è sempre evidenziato un ottimo allineamento tra i dati acquisiti in discesa e in risalita del cavo, mentre per l'ossigeno sono state riscontrate diverse disomogeneità; in particolare nei casi in cui le sonde sono entrate in contatto con i sedimenti del fondo, come evidenziato dal forte aumento della conducibilità elettrica (Fig. 3). Si sottolinea inoltre che, in base alle specifiche del costruttore Idronaut, l'acquisizione dei profili con queste sonde dovrebbe essere eseguita in discesa alla velocità indicativa di 1 m/s, mentre nelle nostre misure, a causa delle caratteristiche dell'argano, la velocità media in discesa è stata di 1,3 m/s con una variabilità di +/- 0,3 m/s.

Contestualmente ai 25 profili è stato eseguito anche il campionamento puntuale della colonna d'acqua alle profondità 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 360 m, prelevando i campioni per la determinazione dell'ossigeno disciolto secondo Winkler. Su un sottogruppo di 150 campioni prelevati a 0, 10, 20, 50, 200 e 360 m, è stata eseguita anche la determinazione con l'elettrodo Metrohm O2-Lumitrode utilizzando bottiglie in vetro da 120 mL con tappo tagliato a becco di flauto (Fig. 2d). Tutte le analisi sono sempre state eseguite entro 4-6 ore dal prelievo; nei due anni considerati la verifica del titolo del sodio tiosolfato utilizzato per la determinazione secondo Winkler è stata eseguita dodici volte (circa ogni 2-3 mesi).

Alcuni confronti tra le metodiche precedentemente descritte per la misura dell'ossigeno disciolto sono riportati nelle figure 4 e 5. I confronti dei dati accoppiati (Fig. 5) evidenziano un ottimo accordo tra i valori ottenuti con il metodo di Winkler e l'elettrodo Metrohm O2-Lumitrode, mentre i valori della sonda tendono a sovrastimare le concentrazioni rispetto alle altre due metodiche. Le differenze appaiono abbastanza sistematiche e non dipendenti dalla profondità o dall'intervallo di concentrazione (Figg. 4-5).

Focalizzandosi sulle acque profonde non in contatto con il sedimento (300 m), nel periodo 01/03/2022 - 13/01/2025, i dati della sonda mostrano una stabilità della risposta (Fig. 6), ad eccezione di un periodo (maggio 2023 - giugno 2024) durante il quale il sen-

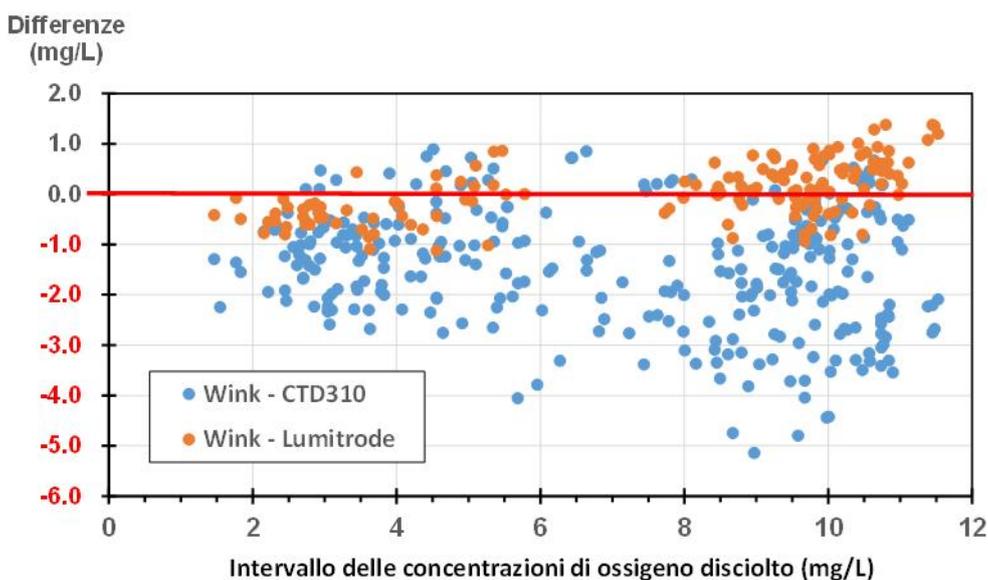


**Figura 4.** Esempio di confronto tra i profili di ossigeno disciolto lungo la colonna d’acqua del Lago Maggiore ottenuti il 5/8/2024 con la sonda multiparametrica CTD 310 Ocean Seven (Idronaut), il metodo di Winkler e l’elettrodo Metrohm O2-Lumitrode (misure su singole profondità prelevate in campo e analizzate in laboratorio)

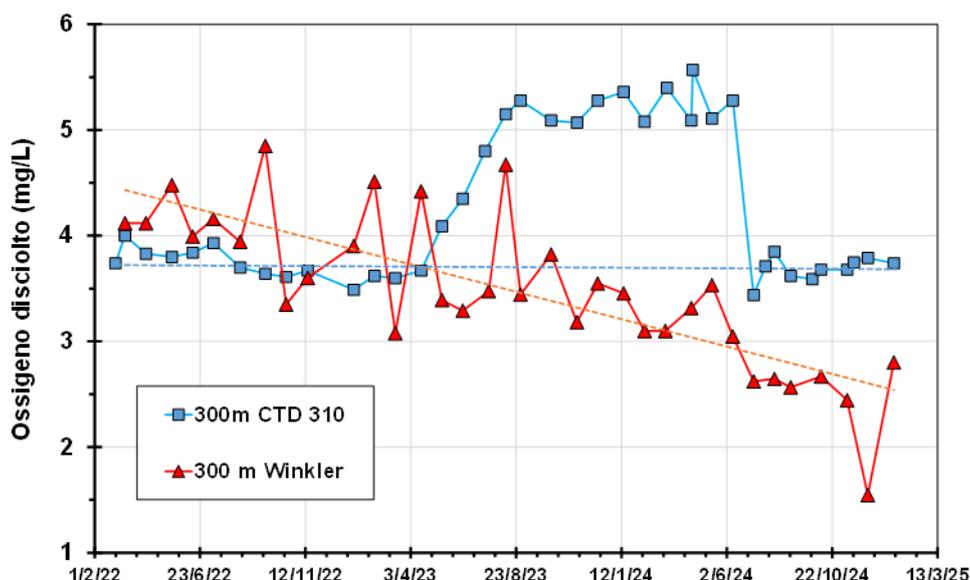
sore dell’ossigeno evidentemente non era stato opportunamente calibrato: i valori si sono infatti riallineati con quelli di aprile 2023 dopo la calibrazione di fine giugno 2024. In figura 6 le concentrazioni dell’ossigeno determinate con il metodo di Winkler sembrano evidenziare una leggera diminuzione nel tempo, pur con una notevole variabilità, probabilmente causata dalla manualità nella determinazione, come il fissaggio del campione in campo o la titolazione in laboratorio (solubilizzazione del precipitato e prelievo, valutazione visiva del punto di viraggio dell’indicatore, variabilità del titolo del sodio tiosolfato) o da errori nella profondità di prelievo per la deriva dell’imbarca-

zione. A questo proposito è necessario sottolineare come la sonda, grazie al sensore di profondità, garantisce una precisa misura della profondità a cui i sensori acquisiscono i dati, mentre nel caso dell’analisi di laboratorio sul campione prelevato mediante bottiglia di campionamento Niskin, ci può essere un’incertezza legata alla deriva del cavo rispetto all’imbarcazione.

In figura 7 sono riportati i valori di temperatura nelle acque profonde del Lago Maggiore (320-360 m) ottenuti con la sonda multiparametrica dal 2016 ad oggi. Grazie all’elevata risoluzione dello strumento è possibile osservare il costante aumento delle temperature, che interessa in modo coerente le diverse profondità



**Figura 5.** Differenze assolute tra le concentrazioni di ossigeno disciolto nelle acque del Lago Maggiore (tutte le profondità, periodo 16/1/2023-13/1/2025) ottenute da metodo di Winkler e CTD 310 Idronaut (in azzurro) e tra metodo di Winkler e elettrodo Metrohm O2-Lumitrode (in arancione) al variare delle concentrazioni



**Figura 6.** Dettaglio dell'andamento dei valori di ossigeno disciolto nelle acque del Lago Maggiore nel periodo 1/3/2022-13/1/2025 alla profondità di 300 m ottenute con la sonda Idronaut CTD 310 e il metodo di Winkler

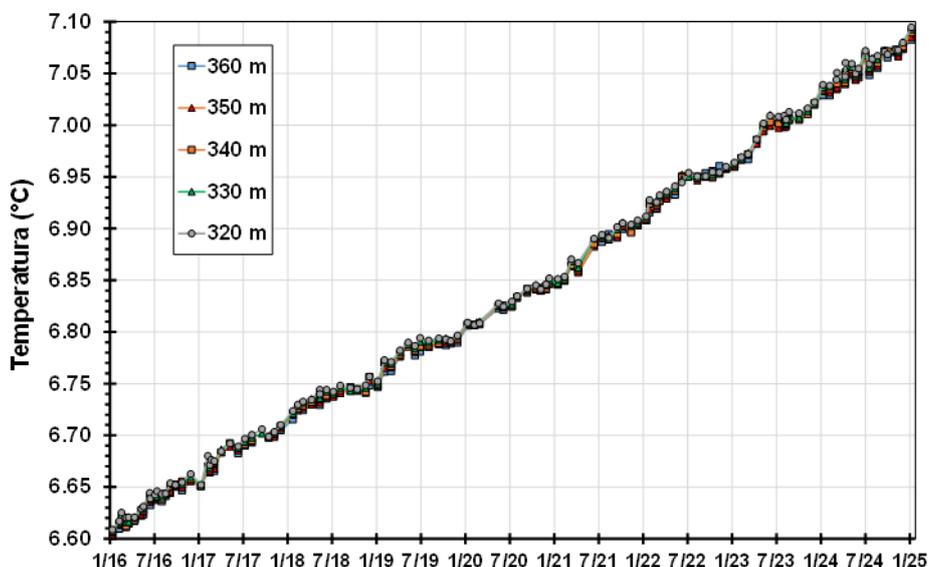
considerate e che conferma il progressivo riscaldamento di queste acque: nel periodo considerato (9 anni) l'aumento complessivo di temperatura è stato di 0,48 °C, pari a circa 0,05 °C/anno. La variabilità di questi dati di temperatura acquisiti con le sonde multiparametriche CTD 304 Plus e 310 Ocean Seven (Idronaut) è stata verificata essere compresa nell'intervallo +/- 0,006 °C (Fig. 8) anche a seguito della ricalibrazione dei sensori Pt100 (aprile 2023), quindi a livelli ben inferiori rispetto alle variazioni riscontrate a lago.

I principali vantaggi e svantaggi delle metodiche considerate, con particolare riferimento alle acque lacustri, sono riassunti in tabella 1. Nel complesso il confronto dei dati fino ad oggi eseguito nel caso del Lago Maggiore evidenzia una buona confrontabilità delle tre metodiche e ne conferma la validità per la valuta-

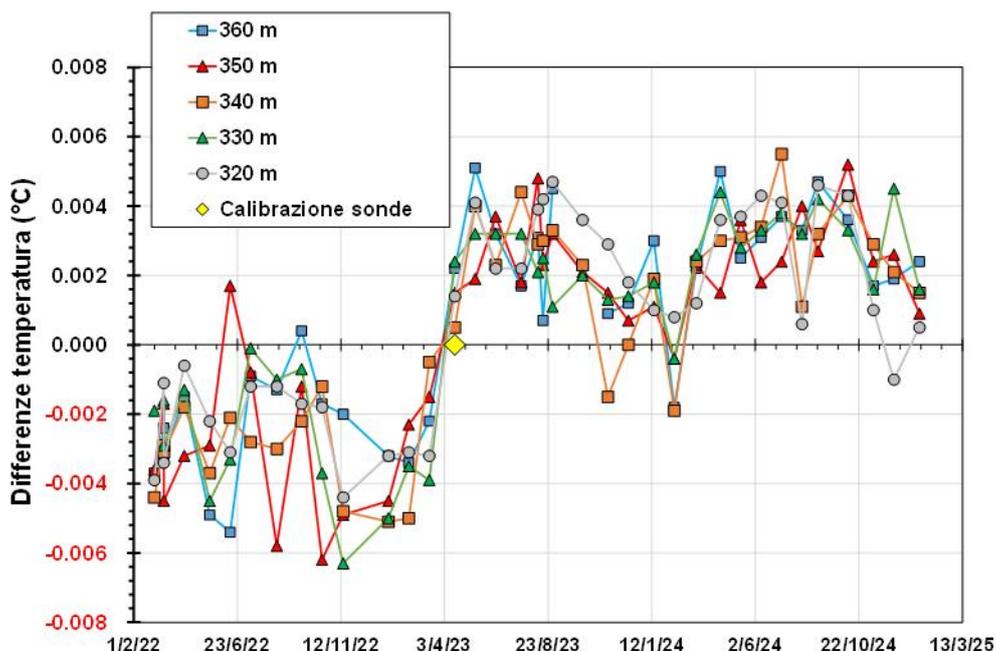
zione delle variazioni temporali e spaziali dei tenori di ossigeno nelle acque. Tale valutazione è fondamentale soprattutto negli studi a lungo termine, come quelli di cui sono oggetto il Lago Maggiore e altri laghi profondi subalpini: le variazioni di temperatura e ossigeno disciolto nelle acque profonde dei laghi avvengono gradualmente e solo metodiche a elevata risoluzione possono evidenziarle.

#### 4. CONCLUSIONI

Le variazioni e i processi che stanno interessando gli ecosistemi lacustri in risposta al riscaldamento climatico necessitano di dati regolari e affidabili per poter essere descritti e compresi. Variabili apparentemente di facile acquisizione come temperatura e ossigeno disciolto sono fondamentali per una descrizione delle



**Figura 7.** Andamento delle temperature nello strato profondo del Lago Maggiore da gennaio 2016 a gennaio 2025; dati acquisiti con la sonda CTD 304 Ocean Seven (Idronaut) alle profondità di 360, 350, 340, 330 e 320 m



**Figura 8.** Differenze di temperatura tra profili del Lago Maggiore acquisiti nel periodo 1/3/2022-13/1/2025 con le sonde CTD 304 e 310 Ocean Seven (Idronaut) alle profondità di 360, 350, 340, 330 e 320 metri; nell’aprile 2023 (rombo giallo) i sensori di temperatura Pt100 sono stati calibrati, questo giustifica il passaggio da differenze negative a positive, comunque sempre all’interno della variazione di +/- 0,006 °C

**Tabella 1.** Valutazione delle 3 metodiche considerate per la determinazione dell’ossigeno disciolto, con particolare riferimento al caso delle acque profonde lacustri

	Vantaggi	Svantaggi
<b>Titolazione in laboratorio metodo di Winkler</b>	<p>Migliore accuratezza se l’analisi viene condotta nel rispetto di tutte le modalità operative (titolo del tiosolfato, precisione nella misura del volume titolato, ripetibilità dell’operatore nell’identificare il viraggio)</p> <p>Limite di rivelabilità 0,2 mg/L se il campione è prelevato e fissato correttamente.</p> <p>Costo contenuto di reagenti, buretta e pipetta in vetro per il prelievo di 50 mL sostenibile da molti laboratori (circa 1500-2000 €).</p>	<p>Solo per analisi puntuali in quanto la determinazione richiede il prelievo in campo per fissare il campione e la successiva analisi in laboratorio (entro 48 ore) che necessita di circa 15 minuti per ogni campione ed è dipendente dalla sensibilità visiva dell’operatore.</p> <p>Necessaria regolare verifica della concentrazione del titolante.</p> <p>Non è utilizzabile per analisi in-situ.</p> <p>Necessita di un laboratorio con reagenti e strutture dedicate alla determinazione.</p> <p>Elevate quantità di ferro, nitriti, o sostanza organica possono interferire con la misura.</p> <p>La misura della profondità di prelievo del campione è indiretta e soggetta a possibili errori.</p>
<b>Elettrodo O<sub>2</sub> ottico a fluorescenza</b>	<p>Limite di rivelabilità 0,2 mg/L se il campione è prelevato correttamente.</p> <p>Bassa manutenzione e ed elevata facilità di utilizzo, velocità di risposta (&lt; 1 minuto).</p> <p>Buona accuratezza dai dati ottenuti.</p> <p>Utilizzabile in-situ e in laboratorio.</p>	<p>Sensibile alla luce ambientale.</p> <p>Costo dell’elettrodo e dello strumento abbastanza elevato (circa 4000€ per Metrohm 914 pH/DO/Cond o 913 pH/DO).</p> <p>La misura della profondità di prelievo del campione è indiretta e soggetta a possibili errori.</p>
<b>Sonda multiparametrica con sensore O<sub>2</sub> ottico a fluorescenza</b>	<p>Indispensabile per ottenere profili verticali; permette di valutare in modo dettagliato gli andamenti con una risoluzione anche di 0,5 m fino a profondità di 500 m e oltre.</p> <p>La misura della profondità di prelievo del campione è diretta grazie alla presenza di sensore dedicato.</p> <p>Bassa manutenzione e facilità di programmazione e scarico dei dati.</p> <p>Elevata velocità di risposta, rispettando le specifiche del costruttore, e possibilità di acquisire altri parametri (es. temperatura, conducibilità, ecc.) utili alla valutazione lungo la colonna d’acqua.</p>	<p>Necessita generalmente di un software dedicato e di collegamento al PC per la programmazione e lo scarico dei dati acquisiti.</p> <p>Accuratezza non troppo elevata.</p> <p>Regolare calibrazione dei sensori e controlli abbinati a misure puntuali, ad esempio con metodo di Winkler per l’ossigeno disciolto.</p> <p>Costo elevato (a partire da 15000€ per una sonda multiparametrica completa di sensori di profondità, temperatura, ossigeno disciolto, conducibilità elettrica).</p> <p>Utilizzabile solo in-situ</p>

dinamiche in corso. Questi parametri sono infatti inclusi nelle eLTER *Standard Observations* (SOs; <https://elter-ri.eu/standard-observations>), ovvero un set di variabili ritenute essenziali per caratterizzare lo stato e la futura evoluzione degli ecosistemi acquatici. È fondamentale definire metodi di misura e protocolli standard di misura e calibrazione che possano garantire dati confrontabili nel lungo periodo. Queste considerazioni confermano l'importanza del monitoraggio regolare e accurato della temperatura e dell'ossigeno disciolto nei corpi idrici superficiali e in particolare nelle acque profonde dei laghi, dove il riscaldamento delle acque e la diminuzione del contenuto di ossigeno sono fenomeni diffusi che necessitano di attenzione. Metodiche affidabili e confrontabili nel tempo sono necessarie per una corretta quantificazione di questi parametri e per una valutazione delle loro variazioni spaziali (es. lungo la colonna d'acqua lacustre) e temporali (stagionali e pluriennali). I dati presentati in questo lavoro confermano la necessità di operare sempre un confronto approfondito tra metodiche in uso e di nuova acquisizione, in particolare per garantire le confrontabilità dei dati nel lungo periodo, fondamentale negli studi a lungo termine.

## BIBLIOGRAFIA

APAT IRSA-CNR (2003a): "Metodi analitici per le acque. 2100 Temperatura". Rapporti 29/2003. APAT: Roma. [https://www.irsacnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/Vol1\\_Sez\\_1000\\_Indice\\_ParteGenerale.pdf](https://www.irsacnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/Vol1_Sez_1000_Indice_ParteGenerale.pdf)

APAT IRSA-CNR (2003b): "Metodi analitici per le acque. 4120 Ossigeno disciolto". Rapporti 29/2003. APAT: Roma. [https://www.irsacnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/Vol1\\_Sez\\_1000\\_Indice\\_ParteGenerale.pdf](https://www.irsacnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/Vol1_Sez_1000_Indice_ParteGenerale.pdf)

ASTM D888 (2018): "Standard Test Methods for Dissolved Oxygen in Water".

ASTM D6764-02 (2019): "Standard Guide for Collection of Water Temperature, Dissolved-Oxygen Concentrations, Specific Electrical Conductance, and pH Data from Open Channels".

CLARK, L., WOLF, R., GRANGER, D., TAYLOR, Z. (1953): "Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography". *J. Appl. Physiol.*, 6, 189–193. <https://doi.org/10.1152/jappl.1953.6.3.189>.

CNR IRSA. Sede di Verbania (2024): "Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma triennale 2022-2024. Campagna 2023". Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 112 pp.

DRESTI, C., ROGORA, M., FENOCCHI, A. (2022): "Hypolimnetic oxygen depletion in a deep oligomictic lake under climate change". *Aquatic Sciences*, 85, 4. <https://doi.org/10.1007/s00027-022-00902-2>.

EN 25813 (1992): "Water quality. Determination of

dissolved oxygen: iodometric method".

FARREL, M.B. (1966): "A brief study of the accuracy protected deep-sea reversing thermometer". Fisheries Research Board of Canada. Manuscript report series Oceanographic and Limnological no. 227.

GSCHWIND, S. (2020): "Determining dissolved oxygen in water: Titration or direct measurement?" WP-056EN Metrohm.

ISO 5813 (1983): "Water quality. Determination of dissolved oxygen: iodometric method"

ISO 5814 (2012): "Water quality. Determination of dissolved oxygen: electrochemical probe method"

ISO 17289 (2014): "Water quality. Determination of dissolved oxygen: optical sensor method"

JANE, S.F., HANSEN, G.J.A., KRAEMER, B.M., et al. (2021): "Widespread deoxygenation of temperate lakes" *Nature* 594, 66–70. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03550-y>

JANE, S.F., MINCER, J.L., LAU, M.P., LEWIS, A.S.L., STETLER, J.T., ROSE, K.C. (2023): "Longer duration of seasonal stratification contributes to widespread increases in lake hypoxia and anoxia". *Global Change Biology*, 29, 1009–1023. <https://doi.org/10.1111/gcb.16525>

JANSEN, J., SIMPSON, G.L., WEYHENMEYER, G.A., HÄRKÖNEN, L.H., PATERSON, A.M., DEL GIORGIO, P.A., PRAIRIE, Y.T. (2024): "Climate-driven deoxygenation of northern lakes". *Nature Climate Change* 14, 832–838. <https://doi.org/10.1038/s41558-024-02058-3>

MORTIMER, C.H. (1981): "The oxygen content of air-saturated fresh waters over ranges of temperature and atmospheric pressure of limnological interest". *SIL Mitteilungen*, 22, 23 pp.

NEGRETTO, H.Y., ZAMBRA (1873): "Deep-sea Soundings and Deep-sea Thermometers". *Nature* 8, 529. <https://doi.org/10.1038/008529a0>

ROGORA, M., BUZZI, F., DRESTI, C., LEONI, B., PATELLI, M., LEPORI, F., MOSELLO, R., SALMASO, N. (2018): "Climatic effects on vertical mixing and deep-water oxygen content in the subalpine lakes in Italy". *Hydrobiologia*, 824, 33–50. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3623-y>

WINKLER, L. (1888): "Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes". *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 21, 2843–2855. <https://doi.org/10.1002/cber.188802102122>

# Metodo *digital droplet* PCR (ddPCR) per il biomonitoraggio di biomarcatori coinvolti in processi di dechlorazione biologica in matrici contaminate da composti organoclorurati

a cura di

Bruna Matturro (\*), Maria Letizia Di Franca, Simona Rossetti, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Roma - Montelibretti

## RIASSUNTO

Questo articolo presenta un protocollo per la quantificazione mediante *digital droplet* PCR (ddPCR) di biomarcatori coinvolti nei processi di dechlorazione biologica di solventi clorurati. L'analisi comprende sia i geni implicati nella dechlorazione riduttiva (*D. mccartyi* 16S rRNA, *tceA*, *bvcA*, *vcrA*) sia quelli coinvolti nella dechlorazione ossidativa (*etnE*, *etnC*). L'utilizzo della ddPCR offre significativi vantaggi rispetto agli approcci quantitativi tradizionali, come la *Real-Time* PCR (qPCR). Tra le principali criticità della qPCR vi sono la necessità di curve di calibrazione con standard di riferimento per la quantificazione assoluta e la presenza di limiti di rilevabilità, che possono compromettere l'accuratezza dell'analisi quando i biomarcatori hanno concentrazioni inferiori a  $10^3$  copie geniche/ $\mu\text{L}$  di reazione. Poiché tali concentrazioni sono rilevanti per determinare il potenziale di recupero per via biologica di una matrice contaminata, queste limitazioni possono influenzare la sensibilità, accuratezza e precisione della quantificazione, aumentando il rischio di valutazioni imprecise sulle capacità di biorisanamento in un processo di bonifica. Pertanto, l'adozione di un metodo quantitativo altamente accurato nelle basse concentrazioni di biomarcatori rappresenta un utile strumento per il biomonitoraggio ambientale. Il protocollo qui riportato è inoltre applicabile ad un'ampia gamma di biomarcatori coinvolti in processi di biodegradazione/biotrasformazione di altre classi di idrocarburi.

## SUMMARY

This article reports a protocol based on the digital droplet PCR (ddPCR) for the quantification of biomarkers involved in the biological dechlorination of chlorinated solvents. The analysis includes both genes involved in reductive (*D. mccartyi* 16S rRNA, *tceA*, *bvcA*, *vcrA*) and oxidative (*etnE*, *etnC*) dechlorination processes. The use of ddPCR offers significant advantages over traditional quantitative approaches such as Real-Time PCR (qPCR). One of the main limitations of qPCR is the need for calibration curves with reference standards for absolute quantification, as well as detection limits that can compromise accuracy when biomarkers are present at concentrations lower than  $10^3$  gene copies/ $\mu\text{L}$  of reaction. Since these estimates are crucial for evaluating the bioremediation potential of a contaminated matrix, a highly accurate method for low biomarker concentrations serves as a valuable tool for environmental biomonitoring. Furthermore, the protocol presented here is applicable to a wide range of biomarkers involved in the biodegradation and biotransformation of other hydrocarbon classes.

## 1. INTRODUZIONE

La ddPCR è una tecnica di quantificazione genica con elevati livelli di sensibilità e accuratezza in grado di quantificare fino a 1 copia genica (Quan et al., 2018; Paruch et al., 2022; Feng et al., 2022). Sebbene ampiamente utilizzata in ambito medico e clinico, la sua applicazione nel biomonitoraggio ambientale e nei processi di biorisanamento è ancora limitata (Di Franca et al., 2022; Tucci et al., 2023; Botti et al., 2024). Il Laboratorio di Microbiologia Ambientale e Biologia Molecolare dell'IRSA ha sviluppato un protocollo ddPCR per quantificare i principali biomarcatori della dechlorazione biologica, tra cui il gene 16S rRNA di *Dehalococcoides mccartyi*, i geni codificanti per le dealo-genasi riduttive (geni *tceA*, *bvcA*, *vcrA*) e altri biomarcatori della dechlorazione ossidativa (ad esempio geni *etnE*, *etnC*). I risultati hanno evidenziato la robustezza e l'accuratezza della ddPCR, dimostrando il suo po-

tenziale per il biomonitoraggio ambientale di matrici contaminate da organoclorurati, ed esteso poi successivamente alla quantificazione di altri geni biomarcatori coinvolti in processi di biodegradazione/biotrasformazione di altre classi di idrocarburi. L'approccio ddPCR descritto si propone quindi come uno strumento efficace per il biomonitoraggio di matrici contaminate nell'ambito di interventi di biorisanamento.

## 2. IL BIOMONITORAGGIO NEL BIORISANAMENTO

Il metodo ddPCR proposto trova largo impiego nell'ambito del biomonitoraggio nei processi di biorisanamento ambientale. Il biorisanamento è una tecnologia di bonifica che sfrutta la capacità naturale di diversi microrganismi di intervenire in processi di biodegradazione o biotrasformazione di inquinanti ambientali. Affinché i processi di biorisanamento siano

\* [bruna.matturro@irsa.cnr.it](mailto:bruna.matturro@irsa.cnr.it)

efficaci e i microrganismi autoctoni possano avviare la biodegradazione o la biotrasformazione degli inquinanti, è indispensabile che siano presenti nella matrice contaminata in concentrazioni adeguate e che siano metabolicamente attivi e favoriti dalle condizioni ambientali (ad es. pH, temperatura, potenziale redox, concentrazione di ossigeno e disponibilità di nutrienti).

L'identificazione e la quantificazione di microrganismi di interesse avvengono attraverso l'analisi biomolecolare di specifici geni che ne caratterizzano la funzione in processi di biorisanamento. Tali geni, considerati una sorta di "carta d'identità" dei ceppi batterici coinvolti nei processi di biodegradazione/biotrasformazione degli inquinanti, sono detti biomarcatori. L'identificazione e quantificazione dei biomarcatori nelle matrici inquinate costituiscono dunque la base del biomonitoraggio (Matturro et al., 2013).

Nello specifico, determinati intervalli di concentrazione di tali biomarcatori forniscono informazioni utili sulle potenzialità di biorecupero di una matrice contaminata e possono supportare la scelta delle strategie di biorisanamento (biostimolazione, *bioaugmentation*, attenuazione naturale monitorata). Il biomonitoraggio può essere condotto in qualsiasi fase di un intervento di biorisanamento, comprese le fasi preliminari, e ha diversi obiettivi specifici:

- Caratterizzazione del sito contaminato: per valutare il potenziale di biorisanamento della matrice inquinata;
- Studi di fattibilità (es. test in microcosmi): per verificare preliminarmente l'efficacia di un approccio di biorisanamento in determinate condizioni;
- Monitoraggio dell'intervento di biorisanamento (biostimolazione o *bioaugmentation*): per raccogliere dati utili a supporto della valutazione dello stato del processo di biodegradazione, dell'efficacia dell'intervento e ottimizzarne l'applicazione.
- Supporto allo sviluppo di nuove tecnologie di bonifica biologica, con particolare attenzione all'ottimizzazione dei parametri operativi dei reattori, al fine di definire condizioni favorevoli alla crescita e all'attività dei microrganismi biodegradatori, nonché ai parametri cinetici e di processo dei sistemi ingegnerizzati.

Ad oggi, sebbene il biomonitoraggio non sia ancora un requisito normativo stringente nei procedimenti di bonifica, è fortemente consigliato soprattutto nei casi in cui venga adottato un approccio di biorisanamento, al fine di supportare le scelte nei procedimenti di bonifica biologica. Tale indagine risulta infatti utile sia nelle fasi conoscitive del procedimento, completando la caratterizzazione ambientale, sia nelle fasi di intervento, dove fornisce supporto nella scelta delle strategie di bonifica e nel monitoraggio dell'efficacia dell'intervento stesso.

### 2.1 Il biomonitoraggio nei processi di dechlorazione di composti organoclorurati

Nella fattispecie delle contaminazioni da solventi clorurati, inclusi percloroetilene (PCE), tricloroetilene

(TCE), cis-dicloroetilene (cis-DCE) e cloruro di vinile (VC), ed in condizioni riducenti, esistono microrganismi specializzati, noti come *Organo Halide Respiring Bacteria* (OHRB), capaci di rimuovere progressivamente gli atomi di cloro da questi composti fino a convertirli nell'innocuo etilene (Saiyari et al., 2018). Questo processo, noto come dechlorazione riduttiva biologica, avviene attraverso reazioni redox in cui i microrganismi utilizzano i composti clorurati come accettori finali di elettroni. Per completare il processo di dechlorazione, è necessario un donatore esterno di elettroni, come l'idrogeno molecolare (H<sub>2</sub>) o composti organici fermentabili. Questo meccanismo porta alla trasformazione sequenziale dei contaminanti clorurati fino all'innocuo etilene.

Nei processi di dechlorazione riduttiva biologica, l'unico microrganismo noto per degradare i composti organoclorurati ad etilene è il *Dehalococcoides mccartyi* (Türkowsky et al., 2018; Schubert et al., 2018). Diversi ceppi di questo microrganismo sono specializzati nella dechlorazione riduttiva di specifici intermedi di tale processo e possono essere identificati attraverso specifici geni, che codificano per gli enzimi chiave, dealogenasi riduttive, funzionalmente coinvolti nelle reazioni redox di dechlorazione sequenziale degli intermedi organoclorurati. Esistono anche processi ossidativi a carico di composti basso clorurati (cis-DCE, VC) che portano alla mineralizzazione di tali solventi mediante cometabolismi in cui sono coinvolti enzimi noti come monossigenasi (Mattes et al., 2015).

I principali biomarcatori utilizzati per il biomonitoraggio delle matrici contaminate da solventi clorurati sono:

- gene 16S rRNA: indica il numero totale di *D. mccartyi* presenti;
- gene *tceA*: indica i ceppi di *D. mccartyi* coinvolti nella dechlorazione riduttiva PCE → TCE → cis-DCE;
- gene *bvcA*: indica i ceppi di *D. mccartyi* coinvolti nella dechlorazione riduttiva cis-DCE → VC → etilene;
- gene *vcrA*: indica i ceppi di *D. mccartyi* coinvolti nella dechlorazione riduttiva VC → etilene.
- gene *etnE* ed *etnC*: indica i microrganismi coinvolti in cometabolismi aerobici per l'ossidazione del VC.

### 2.2 Implicazioni del biomonitoraggio negli interventi di biorisanamento

Nei progetti di biorisanamento di siti contaminati da solventi clorurati, i dati quantitativi dei biomarcatori entro specifici intervalli forniscono una prima valutazione del potenziale di biorisanamento di una matrice contaminata (EPA, 2006; Lu et al., 2006; Matturro et al., 2021; Taggart et al., 2021). Nello specifico, valori inferiori a 10<sup>3</sup> copie geniche/L indicano un basso potenziale di biorisanamento, mentre concentrazioni comprese tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> copie di geni/L suggeriscono un potenziale di biorecupero che può essere migliorato ad esempio attraverso la biostimolazione. Quando le concentrazioni superano 10<sup>7</sup> copie di geni/L, si può ipotizzare la presenza di un elevato potenziale di

biorisanamento, caratterizzato dalla presenza di processi biodegradativi già attivi. Tuttavia, ogni valutazione circa il ruolo funzionale dei biomarcatori individuati nella matrice analizzata è sempre sito specifica e necessita di una interpretazione sulla base delle condizioni e dei parametri chimico fisici del sito.

In questo contesto, gli approcci di biologia molecolare sono comunemente utilizzati per il biomonitoraggio. Negli ultimi vent'anni, la *Real-Time* PCR (qPCR) è stata il principale metodo impiegato per la quantificazione di *D. mccartyi* e dei geni codificanti per le deoligenasi riduttive nel contesto di procedure di bonifica biologica di matrici contaminate da composti organoclorurati (Taggart et al., 2021).

Sulla base della nostra esperienza nell'analisi di oltre 3.000 campioni ambientali contaminati, tra cui acque sotterranee, suolo, sedimenti e consorzi microbici, la qPCR si è dimostrata un approccio affidabile per la quantificazione dei biomarcatori deodoranti (Cupples et al., 2008; Maturro et al., 2012; Maturro et al., 2013).

Tuttavia, la sua sensibilità, accuratezza e precisione diminuiscono per abbondanze  $\leq 10^3$  copie geniche/L. Pertanto, valori al di sotto di questa soglia dovrebbero essere interpretati con cautela, poiché questo aspetto è particolarmente critico nell'analisi di campioni ambientali contaminati con basse concentrazioni di biomarcatori. In questi casi, il rischio è di ottenere una valutazione errata del potenziale di biorisanamento del sito. Un'altra criticità riguarda la stabilità degli standard di riferimento utilizzati nella qPCR per la quantificazione assoluta tramite regressione lineare. È possibile usare ampliconi lunghi come *standards* di riferimento, tuttavia questi devono essere preparati freschi, evitando cicli ripetuti di congelamento e scongelamento che potrebbero causare degradazione dell'amplicone stesso. Analogamente, quando si utilizzano plasmidi con geni clonati come standard, è fondamentale monitorarne regolarmente l'integrità per prevenire fenomeni di superavvolgimento, che potrebbero compromettere l'affidabilità della quantificazione.

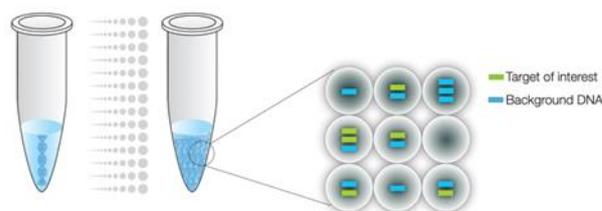
### 3. PRINCIPIO DEL METODO ddPCR

La ddPCR è una tecnica innovativa per la quantificazione assoluta del DNA target e/o dell'espressione genica (RNA o cDNA). In questo lavoro viene presentato il protocollo per la quantificazione del DNA estratto da campioni ambientali, come suolo, acqua e sedimenti. Tuttavia, il metodo può essere applicato anche all'analisi dell'espressione genica, previa estrazione di RNA e successiva retrotrascrizione in cDNA (aspetto non trattato in questo articolo).

La ddPCR si basa su tre fasi principali: la partizione del campione, l'amplificazione in micro-reazioni e il conteggio digitale, che consente di ottenere una quantificazione assoluta del DNA target senza la necessità di curve standard.

#### 3.1 Partizione del campione

Uno degli aspetti fondamentali della ddPCR è la suddivisione della miscela di reazione in migliaia di goc-



**Figura 1.** Schema della partizione del DNA target nelle goccioline della miscela di reazione ddPCR. Un singolo campione può essere suddiviso fino a 20.000 goccioline (Immagine tratta da Bulletin 6407, Bio-Rad, USA)

cioline di dimensioni nanolitriche attraverso l'uso di olio (Figura 1). All'interno di queste goccioline, il DNA target viene distribuito in modo casuale: alcune goccioline non contengono alcuna molecola di DNA, altre ne contengono una, mentre altre ancora possono contenerne più di una. Questa suddivisione permette di trasformare una reazione PCR convenzionale in migliaia di micro-reazioni indipendenti. La distribuzione casuale del DNA segue un modello di Poisson, che consente di stimare con precisione la concentrazione iniziale del target nel campione.

#### 3.2 Amplificazione in micro-reazioni

Dopo la partizione, la miscela viene sottoposta a PCR su un termociclatore, amplificando il DNA all'interno di ciascuna gocciolina in maniera indipendente. Una volta completata l'amplificazione, le goccioline vengono analizzate individualmente mediante un lettore di fluorescenza, che distingue le gocce PCR-positive (contenenti il target amplificato) da quelle PCR-negative (prive di DNA target amplificato). L'analisi avviene pozzetto per pozzetto, con le gocce che passano singolarmente attraverso un sistema di rilevamento ottico a due colori, che permette di distinguere la fluorescenza delle goccioline contenenti il DNA amplificato rispetto a quelle prive di amplificazione. Questo approccio consente di ottenere un'elevata sensibilità e accuratezza nella quantificazione del target, in quanto ogni goccia rappresenta una reazione PCR autonoma. Inoltre, la suddivisione del DNA target in migliaia di reazioni isolate riduce significativamente l'effetto degli inibitori presenti nei campioni ambientali, migliorando la qualità dell'analisi.

#### 3.3 Conteggio digitale e distribuzione di Poisson:

Una volta terminata la PCR, il lettore di fluorescenza determina la frazione di goccioline positive rispetto al numero totale di goccioline analizzate. L'analisi dei dati si basa sul modello di distribuzione di Poisson, che permette di stimare la concentrazione del DNA target con un livello di confidenza del 95%. Il principio della distribuzione di Poisson nella ddPCR consente di determinare la probabilità che ogni goccia contenga 0, 1, 2, 3 o più copie di DNA target. Tiene inoltre conto della variabilità nella distribuzione delle molecole target, fornendo una stima precisa della sua concentrazione nel campione. La precisione del conteggio aumenta con il numero totale di gocce: con 20.000 gocce, il sistema ddPCR è in grado di coprire un intervallo dinamico lineare da 1 a 100.000 copie

target circa. Grazie alla sua natura digitale e statisticamente sostenuta, la ddPCR rappresenta un approccio altamente sensibile e accurato per la quantificazione genica, soprattutto quando le concentrazioni sono molto basse. Uno dei principali vantaggi rispetto alla qPCR è infatti la capacità di rilevare eventi rari e quantificare il target in campioni con concentrazioni estremamente ridotte. Inoltre, proprio per la natura statistica del metodo, non è previsto l'utilizzo di rette di calibrazione e dunque di standards di riferimento, eliminando il rischio di variazioni sperimentali e garantendo una quantificazione assoluta del DNA con un'elevata riproducibilità. Grazie a queste caratteristiche, la ddPCR è adatta all'analisi quantitativa di biomarcatori ambientali coinvolti in processi biologici complessi, incluso il biorisanamento.

**4. METODO ddPCR**

Il metodo di quantificazione assoluta ddPCR qui riportato è stato eseguito utilizzando il sistema QX200™ Droplet Digital™ PCR (ddPCR™, Bio-Rad, USA) che include il Droplet Generator ed il Droplet Reader System. La quantificazione è condotta utilizzando come template il DNA estratto dal campione di interesse. Il protocollo di quantificazione ddPCR prevede le seguenti fasi:

**Fase 1: Estrazione e quantificazione del DNA**

Il DNA viene estratto da matrici contaminate (suolo, sedimenti, acque) o da colture microbiche in scala di laboratorio usando il DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Germantown, MD) con delle modifiche in base alla tipologia di campione, come di seguito riportato.

**Acqua di falda.** Si filtra da 500 mL a 1 L di acqua su filtri idrofilici in polycarbonato (dimensione dei pori 0.2 µm, diametro 47 mm). I filtri possono essere conservati a -20 °C fino all'estrazione del DNA. Per l'estrazione del DNA genomico si inserisce il filtro nelle provette del kit di estrazione contenente le beads per la lisi cellulare e si procede seguendo il protocollo del kit. Il DNA viene eluito in 50 µL di acqua sterile deionizzata filtrata.

**Suolo o sedimento.** L'estrazione del DNA genomico si conduce su 1 g di suolo o sedimento e si procede con le indicazioni del kit. Il DNA viene eluito in 50 µL di acqua sterile deionizzata filtrata.

**Culture microbiche in scala di laboratorio.** In base alla densità cellulare, si filtra da 1 mL a 50 mL di coltura microbica liquida su filtri idrofilici in polycarbonato (dimensione dei pori 0.2 µm, diametro 13 mm). I filtri possono essere conservati a -20 °C fino all'estrazione del DNA. Per l'estrazione del DNA genomico si inserisce il filtro nelle provette del kit di estrazione contenente le beads per la lisi cellulare e si procede seguendo il protocollo del kit. Il DNA viene eluito in 50 µL di acqua sterile deionizzata filtrata.

A seguito dell'estrazione, si procede con la quantificazione del DNA mediante saggi fluorimetrici utilizzando i Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kits (Invitrogen™, USA). La concentrazione ottimale di DNA per le reazioni di ddPCR è di circa 3 ng/µL, mentre non è consigliabile superare i 50 ng/µL.

È inoltre importante considerare che il DNA estratto da campioni ambientali può contenere elementi inibitori delle reazioni di amplificazione genica. Per questo motivo, si raccomanda di diluire il DNA estratto con un fattore di diluizione di almeno 1:10 o 1:100.

**Tabella 1.** Primers e sonde usate per la quantificazione ddPCR

Biomarcatore target	Primers e sonde	Sequenze	Riferimenti
<i>D. mccartyi</i> 16S rRNA	Dhc 1200F Dhc 1271R Dhc 1240-Probe	5'-CTGGAGCTAATCCCCAAAGCT-3' 5'-CAACTTCATGCAGGCGGG-3' 5'-TCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGAA-3'	He et al., 2003
tceA	tceA 1270F tceA 1336R tceA 1294-Probe	5'-ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA-3' 5'-GCGGCATATATTAGGGCATCTT-3' 5'-TGGGCTATGGCGACCGCAGG-3'	Johnson et al., 2005
vcrA	vcrA 1022F vcrA 1093R vcrA 1042-Probe	5'-CGGGCGGATGCACTATTTT-3' 5'-GAATAGTCCGTGCCCTTCCTC-3' 5'-CGCAGTAACTCAACCATTTCCTGGTAGTGG-3'	Ritalahti et al., 2006
bvcA	bvcA 925F bvcA 1017R bvcA 977-Probe	5'-AAAAGCACTTGGCTATCAAGGAC-3' 5'-CCAAAAGCACCACCGGTC-3' 5'-TGGTGGCGACGTGGCTATGTGG-3'	Ritalahti et al., 2006
etnC	etnC-F	5'-ACCCTGGTCGGTGTKSTYTC-3'	Jin & Mattes, 2010
	etnC-R	5'-TCATGTAMGAGCCGACGAAGTC-3'	
etnE	etnE-F	5'CAGAAYGCTGYGACATYATCCA-3'	Jin & Mattes, 2010
	etnE-R	5'-CSGGYGRCCCGAGTAGTTWCC-3'	

In aggiunta, per garantire un saggio ddPCR efficace, è fondamentale tenere conto che l'intervallo dinamico lineare va da 1 a 120.000 copie geniche per 20 µL di reazione ( $6 \cdot 10^3$  copie geniche/ µL reazione).

### Fase 2: Preparazione mix di reazione di amplificazione

Si prepara una miscela di reazione di PCR per ogni gene *target* in un volume totale di 22 µL per ogni campione che comprende la miscela di Taq polimerasi, i *primers* ed eventualmente la sonda, il DNA *target* e acqua deionizzata sterile filtrata. In base al saggio scelto e alla presenza o meno della sonda, si preparano le miscele come segue:

#### Primers con sonda

- ddPCR Supermix for Probes® (Bio-Rad, USA)
- 900 nM di ciascun *primer* (Tabella 1)
- 300 nM di sonda TaqMan (Tabella 1)
- H<sub>2</sub>O sterile, a volume
- 3 µL di DNA (3 ng/µL)

-----  
Totale 22 µL

#### Primers senza sonda

- ddPCR EvaGreen Supermix® (Bio-Rad, Italia),
- 300 nM di ciascun *primer* (Tabella 1)
- H<sub>2</sub>O sterile
- 3 µL di DNA (3 ng/µL).

-----  
Totale 22 µL

E' consigliabile preparare le miscele per il numero totale di campioni ed un bianco per ogni *target* genico da quantificare (*Not Template Control*, NTC). Le concentrazioni di *primers* qui riportate, sono state ottimizzate previa sperimentazione di diversi range di concentrazione dei set di *primers* su *target* a concentrazione nota (*standards* di ampliconi).

Prima di aggiungere il DNA, si si suddivide la miscela di reazione nei pozzetti di una piastra a 96-pozzetti (19 µL miscela di reazione) a cui poi si aggiungono 3 µL di DNA. La miscela è così completa e si può procedere con la generazione delle gocce (Fase 2).

### Fase 3: Generazione delle gocce

La generazione delle gocce avviene utilizzando il Droplet Generator all'interno del quale di ripone una cartuccia a otto canali con relativa guarnizione di copertura dei pozzetti (DG8™ Cartridges e Gaskets, Bio-Rad, USA) posizionata su un supporto per cartucce (DG8 Cartridge Holder™, Bio-Rad, USA).

Nella cartuccia sono indicati i pozzetti in cui si trasferiscono prima i 20 µL della miscela di reazione PCR preparata nella fase 1, e i pozzetti in cui si aggiungono successivamente 70 µL di *Droplet Generation Oil for Probes* (Bio-Rad, USA) nel caso di saggi che prevedono le sonde, oppure *Droplet Generation Oil for EvaGreen* (Bio-Rad, USA) nel caso di saggi che non prevedono l'utilizzo di sonde.

Dopo aver caricato i rispettivi pozzetti con la miscela

di reazione e l'olio, si copre la cartuccia con l'apposita guarnizione, e si trasferisce nel *Droplet Generator* che consentirà la formazione delle gocce in pochi secondi. Al termine della generazione delle gocce, si otterranno 40 µL di miscela con la partizione nell'emulsione. L'emulsione di ogni campione viene trasferita in una piastra da 96 pozzetti da PCR, la quale deve essere sigillata termicamente con una pellicola perforabile utilizzando il sigillatore PX1™ PCR *plate sealer* (Bio-Rad, USA). La piastra contenente la miscela di reazione partizionata nelle gocce è ora pronta per la fase di amplificazione genica in un termociclatore.

### Fase 4: Amplificazione genica

Si trasferisce la piastra in un termociclatore. Per i geni 16S rRNA di *D. mccartyi*, *tceA*, *bvcA* e *vcrA* (saggio con sonda) sono state usate le seguenti condizioni di amplificazione :

- 10 min a 95 °C
- 39 cicli di 30 sec a 94 °C
- 1 min a 60 °C (*ramp rate* 2 °C/s)\*
- 10 min a 98 °C
- 4 °C.

Per i geni *etnE* ed *etnC* (saggio senza sonda) sono:

- 5 min a 95 °C
- 39 cicli di 30 sec a 95 °C
- 1 min a 58 °C (*ramp rate* 2 °C/s)\*
- 5 min a 4 °C
- 5 min a 90 °C
- 4 °C.

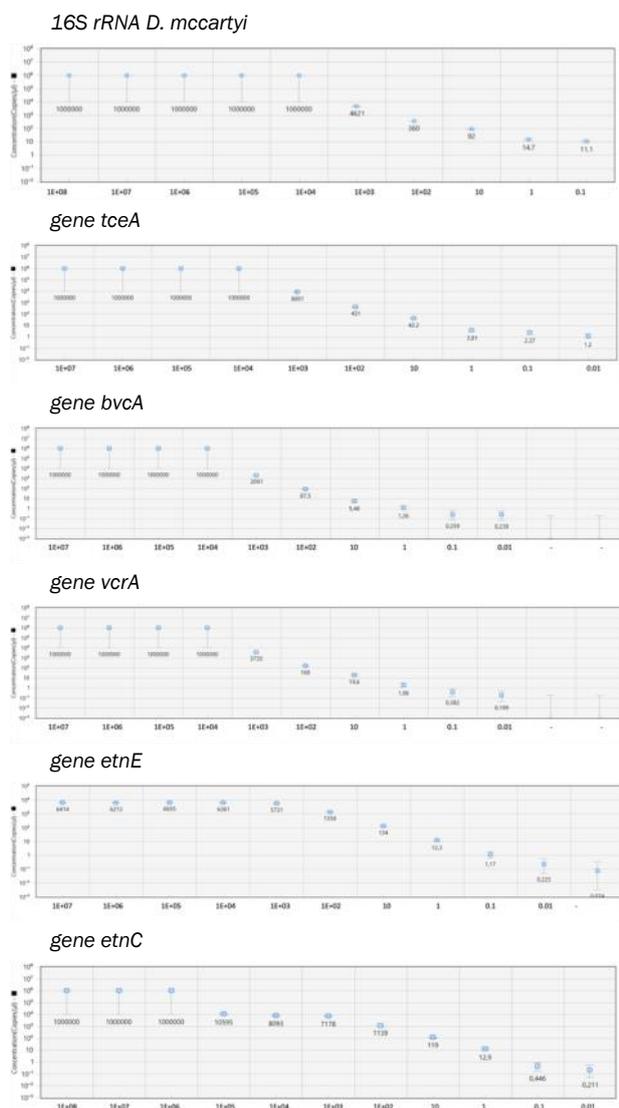
(\*):l'utilizzo della *ramp rate* garantisce che ogni goccia possa raggiungere la giusta temperatura ad ogni ciclo di amplificazione.

### Fase 5: Lettura dei segnali di fluorescenza ed elaborazione dati

Al termine dell'amplificazione PCR, si trasferisce la piastra nel lettore di fluorescenza Droplet Reader (Bio-Rad, USA) che rileva le gocce fluorescenti positive e negative per calcolare le concentrazioni dei geni *target*. I dati sono analizzati mediante QuantaSoft Software (Bio-Rad, USA) che restituisce il dato quantitativo come numero di copie geniche/µL di reazione con intervalli di confidenza al 95%. Al fine di ricavare il dato di copie geniche/L acqua o copie geniche/mL di coltura o copie geniche/g suolo di campione iniziale è necessario tenere conto della quantità di campione da cui è stato estratto il DNA, del volume di eluizione del DNA in acqua, del fattore di diluizione del DNA usato per l'amplificazione genica e di quanto volume di DNA è stato usato nella miscela di reazione.

## 5. RISULTATI ddPCR PER BIOMARCATORI DECLORANTI

Riportiamo l'applicazione del metodo ddPCR per la quantificazione dei biomarcatori 16S rRNA di *D. mccartyi*, dei geni codificanti per le *dealogenasi* riduttive (*tceA*, *bvcA*, *vcrA*) e dei geni *etnE* ed *etnC*, che codificano per monossigenasi coinvolte nei processi di dechlorazione ossidativa (Figura 2). In particolare, il



**Figura 2.** Quantificazione mediante ddPCR dei biomarcatori coinvolti nei processi di dechlorazione biologica, utilizzando un campione a copie geniche note

protocollo ddPCR è stato sviluppato utilizzando diluizioni seriali 1:10 di DNA genomico estratto da un campione contenente tutti i *targets genici* analizzati, coprendo un intervallo di concentrazione da 1 a 10<sup>10</sup> copie geniche/μL di reazione. Come mostrato in Figura 2, la ddPCR si è dimostrata efficace nella quantificazione di tutti i biomarcatori analizzati. I risultati evidenziano un’ottima linearità della quantificazione nelle fasce di concentrazione più basse, dimostrando l’elevata sensibilità della ddPCR anche per target a basse abbondanze. Il metodo si è rivelato efficace per concentrazioni superiori a 10<sup>4</sup> copie geniche/μL di reazione, riuscendo in alcuni casi a discriminare fino a 1 copia/μL di reazione. Tuttavia, come atteso, all’aumentare della concentrazione del target, nell’intervallo di concentrazione compreso tra 10<sup>10</sup> e 10<sup>5</sup> copie geniche/μL di reazione, si osserva un effetto plateau dovuto alla saturazione delle goccioline quando il *target genico* è molto abbondante. Questo conferma la necessità di diluire i campioni con concentrazioni elevate per mantenere la quantificazione nel range di linearità del metodo .

L’analisi è stata condotta su diluizioni seriali 1:10, coprendo un intervallo lineare che va da 1 a 10<sup>10</sup> copie geniche/μL di reazione .

**6. CONCLUSIONI**

Il metodo *digital droplet* PCR (ddPCR) proposto rappresenta un approccio innovativo per la quantificazione di biomarcatori coinvolti nei processi di biodegradazione e biotrasformazione degli inquinanti nel contesto del biorisanamento. Questo metodo supera alcune limitazioni quantitative dei metodi tradizionali, come la qPCR, migliorando la precisione e l’accuratezza dei dati ed eliminando la necessità di curve di calibrazione. Il protocollo sviluppato è stato testato su un DNA contenente tutti i biomarcatori di interesse, analizzato in un ampio intervallo di concentrazione, compreso tra 1 e 10<sup>10</sup> copie geniche/μL di reazione. I risultati confermano l’elevata sensibilità della ddPCR nella quantificazione assoluta di biomarcatori a basse concentrazioni, che sono tra le più frequentemente rilevate nei campioni ambientali contaminati. Ciò rende la ddPCR uno strumento estremamente efficace per studi di biomonitoraggio ambientale e biorisanamento di matrici contaminate da organoclorurati. Il protocollo descritto rappresenta un utile strumento per l’applicazione della ddPCR nel biomonitoraggio di matrici inquinate, ma anche per analisi su colture in scala di laboratorio o sistemi ingegnerizzati (Di Franca et al., 2022; Botti et al., 2024). Inoltre, questa metodologia può essere estesa ad altri *target* genici coinvolti nella biodegradazione e biotrasformazione di diverse classi di idrocarburi, come già riportato in precedenti pubblicazioni (Tucci et al., 2023) .

**BIBLIOGRAFIA**

BOTTI A., MUSMECI E., MATTURRO B., VANZETTO G., BOSTICCO C., NEGRONI A., ROSSETTI S., FAVA F., BIAGI E., ZANAROLI G. (2024): “Chemical-physical parameters and microbial community changes induced by electrodes polarization inhibit PCB dechlorination in a marine sediment”, *J. Hazard. Mater.*, 469, 133878. doi: 10.1016/j.jhazmat.2024.133878.

CUPPLES A. M. (2008): “Real-Time PCR quantification of dehalococcoides populations: Methods and applications”, *J. Microbiol. Methods*, 72, 1–11. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.005.

DI FRANCA M.L., MATTURRO B., CROGNALE S., ZEPILLI M., DELL’ARMI E., MAJONE M., PETRANGELI P., ROSSETTI S. (2022): “Microbiome Composition and Dynamics of a Reductive/Oxidative Bioelectrochemical System for Perchloroethylene Removal: Effect of the Feeding Composition”, *Front. Microbiol.*, 13, 951911. doi: 10.3389/fmicb.2022.951911.

EPA/600/R-06/029 (2006): “Evaluation of the Role of Dehalococcoides Organisms in the Natural Attenuation of Chlorinated Ethylenes in Ground Water”. U.S. Environmental Protection Agency, July 2006. Available at: <https://archive.epa.gov/ada/web/pdf/p1001gzm.pdf>.

- FENG X.J., YI H.M., REN X.X., REN J.L., GE J.R., WANG F.G. (2020): "Digital PCR and its application in biological detection", *Yi Chuan*, 42(4), 363-373. doi: 10.16288/j.yczs.19-351.
- LI H., BAI R., ZHAO Z., TAO L., MA M., JI Z., JIAN M., DING Z., DAI X., BAO F., LIU A. (2018): "Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases", *Biosci. Rep.*, 38, Article BSR20181170. doi: 10.1042/BSR20181170.
- HE J., RITALAHTI K.M., AIELLO M.R., LÖFFLER F.E. (2003): "Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2), 996-1003. doi: 10.1128/AEM.69.2.996-1003.2003.
- JIN Y.O., MATTES T.E. (2010): "A quantitative PCR assay for aerobic, vinyl chloride- and ethene-assimilating microorganisms in groundwater", *Environ. Sci. Technol.*, 44(23), 9036-9041. doi: 10.1021/es102232m.
- JOHNSON D.R., LEE P.K., HOLMES V.F., FORTIN A.C., ALVAREZ-COHEN L. (2005): "Transcriptional expression of the *tceA* gene in a *Dehalococcoides*-containing microbial enrichment", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11), 7145-7151. doi: 10.1128/AEM.71.11.7145-7151.2005.
- LU X., WILSON J.T., KAMPBELL D.H. (2006): "Relationship between *Dehalococcoides* DNA in ground water and rates of reductive dechlorination at field scale", *Water Res.*, 40(16), 3131-3140. doi: 10.1016/j.watres.2006.05.030.
- MATTES T.E., ALEXANDER A.K., COLEMAN N.V. (2010): "Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution", *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 445-475. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00210.x.
- MATTURRO B., AULENTA F., MAJONE M., PAPINI M.P., TANDOI V., ROSSETTI S. (2012): "Field distribution and activity of chlorinated solvents degrading bacteria by combining CARD-FISH and real time PCR", *N. Biotechnol.*, 30(1), 23-32. doi: 10.1016/j.nbt.2012.07.006.
- MATTURRO B., HEAVNER G.L., RICHARDSON R.E., ROSSETTI S. (2013): "Quantitative estimation of *Dehalococcoides mccartyi* at laboratory and field scale: comparative study between CARD-FISH and Real Time PCR", *J. Microbiol. Methods*, 93(2), 127-133. doi: 10.1016/j.mimet.2013.02.011.
- MATTURRO B., MAJONE M., AULENTA F., ROSSETTI S. (2021): "Correlations between maximum reductive dechlorination rates and specific biomass parameters in *Dehalococcoides mccartyi* consortia enriched on chloroethenes PCE, TCE and *cis*-1,2-DCE", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 97(6), fiab064. doi: 10.1093/femsec/fiab064.
- MATTURRO B., ROSSETTI S. (2013): "Bonifica di siti contaminati da solventi clorurati: ruolo del biomonitoraggio", *Energia e Ambiente*, 48(11), 48-51. Available at: [https://energia-plus.it/wp-content/uploads/sites/5/2013/09/EA\\_48-51.pdf](https://energia-plus.it/wp-content/uploads/sites/5/2013/09/EA_48-51.pdf).
- PARUCH L. (2022): "Molecular Diagnostic Tools Applied for Assessing Microbial Water Quality", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19(9), 5128. doi: 10.3390/ijerph19095128.
- QUAN P.L., SAUZADE M., BROUZES E. (2018): "dPCR: A Technology Review", *Sensors (Basel)*, 18(4), 1271. doi: 10.3390/s18041271.
- RITALAHTI K.M., AMOS B.K., SUNG Y., WU Q., KOENIG-SBERG S.S., LÖFFLER F.E. (2006): "Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4), 2765-2774. doi: 10.1128/AEM.72.4.2765-2774.2006.
- SAIYARI D.M., CHUANG H.P., SENORO D.B., LIN T.F., WHANG L.M., CHIU Y.T., CHEN Y.H. (2018): "A review in the current developments of genus *Dehalococcoides*, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater", *Sustainable Environment Research*, 28(4), 149-157. doi: 10.1016/j.serj.2018.01.006.
- SCHUBERT T., ADRIAN L., SAWERS R.G., DIEKERT G. (2018): "Organohalide respiratory chains: composition, topology and key enzymes", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 94(4). doi: 10.1093/femsec/fiy035.
- TAGGART D.M., CLARK K. (2021): "Lessons Learned from 20 Years of molecular biological tools in petroleum hydrocarbon remediation", *Remediation*, 31, 83-95. doi: 10.1002/rem.21695.
- TURKOWSKY D., JEHMLICH N., DIEKERT G., ADRIAN L., VON BERGEN M., GORIS T. (2018): "An integrative overview of genomic, transcriptomic and proteomic analyses in organohalide respiration research", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 94(3), fiy013. doi: 10.1093/femsec/fiy013.
- TUCCI M., FERNÁNDEZ-VERDEJO D., RESITANO M., CIACIA P., GUIASOLA A., BLÁNQUEZ P., MARCOURREA E., CRUZ VIGGI C., MATTURRO B., CROGNALE S., AULENTA F. (2023): "Toluene-driven anaerobic biodegradation of chloroform in a continuous-flow bioelectrochemical reactor", *Chemosphere*, 338, 139467. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.139467.

### Giornata Internazionale del Mediterraneo *Mare Nostrum*. Convegno Camera Dei Deputati (8 Luglio 2024): Considerazioni conclusive

Il Mediterraneo rappresenta una realtà scientifica economica e sociale, una comunità vorrei dire, che per le problematiche che pone può quasi essere considerata un modello. L'acqua da un lato è vita ed acuisce l'ingegno, dall'altro può divenire uno strumento di degrado e distruzione. Oltre alle esecrabili ragioni razziali e di odio fra i popoli, le guerre in Medio Oriente sulle alture del Golan nella valle del Giordano sono anche legate al controllo delle poche risorse idriche, come purtroppo avviene anche nel caso di altre guerre nel mondo (si ricordi il tempo delle 7 guerre dell'ACQUA).

L'inquinamento nelle sue forme più tradizionali, ma anche più recenti-plastica, residui farmaceutici ed alimentari, rifiuti elettronici, scarti di ogni tipo-obbliga a considerare la bonifica delle coste, la prevenzione e la loro cura. I recenti dati scientifici dimostrano che continuando a ritardare gli interventi il rischio di oggi, sostanzialmente ambientale, diventi-come già si intravede-anche igienico-sanitario a causa dei processi di inalazione e ingestione degli inquinanti più mobili e bioaccumulabili.

Le differenze e diseguaglianze in termini di risorse disponibili e di economia fra la riva settentrionale e quella meridionale del Mare Nostrum richiedono interventi di collaborazione partecipata capaci di affrontare anche le emergenze migratorie del nostro tempo. Oggi è solo la messa a disposizione, accanto alle risorse economiche, di risorse intellettuali, di conoscenze, di capitale umano, di beni immateriali che può divenire una strategia vincente per il Mediterraneo.

Le strade che il Convegno ha indicato ai nostri politici sono 3:

- sul piano scientifico: le tessere del puzzle ci sono tutte, si tratta di concretizzarne l'immagine complessiva con un approccio olistico e non deterministico; nessun indicatore da solo può indirizzare verso la strada giusta; la scienza ci ha dotato degli strumenti preventivi e riparativi necessari partendo dal principio ormai accettato del carattere globale dell'ambiente, che ne preclude la trattazione come su sistemi locali e semplici
- sul piano politico: ben vengano iniziative come quelle del nostro Governo con il piano Mattei, ma non bastano: ci vuole una visione partecipata del problema con un tavolo di interlocuzione fra tutti i soggetti interessati ed una *governance*, diversa quindi dal governo tradizionale di processo, che li rappresenti
- sul piano sociale il carattere di mare quasi chiuso conferisce al Mediterraneo il connotato di risorsa distribuibile e gestibile in tutti i suoi aspetti, energetico, ambientale, turistico, financo alimentare: si tratta di attrezzarsi adeguatamente partendo dal concetto di comunità da cui siamo partiti con questo resoconto facendo del nostro Mediterraneo un esemplare ed un modello di sostenibilità.

L'Agenda 2030 delle Nazioni Unite, come noto, ha tra gli obiettivi quello di Garantire a tutti la disponibilità e la gestione sostenibile dell'acqua e delle strutture igienico-sanitarie (Obiettivo 6).

Nel 2024 è stato pubblicato il "Rapporto mondiale delle Nazioni Unite sullo sviluppo delle risorse idriche 2024: l'acqua per la prosperità e la pace" a

cura dell'UNESCO. Tale rapporto è stato anche oggetto di studio da parte della Camera dei Deputati (<https://documenti.camera.it/leg19/dossier/pdf/Am0060.pdf> - <https://documenti.camera.it/leg19/dossier/pdf/Am0060.pdf>), mettendo in evidenza la crisi idrica degli ultimi anni, sia per i maggiori rischi di inondazione che sono in aumento e per la grave scarsità idrica. Ad esempio, tra il 2002 e il 2021, la siccità ha colpito più di 1,4 miliardi di persone a livello mondiale, causando la morte di quasi 21.000 di esse. Questa situazione può portare ad una crisi importante nelle nostre società, sovrapponendosi e sovrastando di gran lunga questioni fondamentali quali l'istruzione, la salute e lo sviluppo sostenibile, anche considerando che "il 50% dei posti di lavoro nei Paesi ad alto reddito dipende dall'Acqua, percentuale che sale all'80% nei Paesi a basso reddito". Di fronte a queste sfide, il rapporto propone di:

- rafforzare l'educazione in materia di Acqua;
- intensificare la raccolta di dati per orientare le politiche pubbliche;
- aumentare gli investimenti privati per garantire una gestione più sostenibile delle risorse idriche;
- attribuire un ruolo centrale alla cooperazione internazionale (anche ricordato ed enfatizzato l'esempio della Conferenza delle Nazioni Unite sull'Acqua del 2023 a New York). A tal proposito viene ricordato che "l'accesso universale all'acqua potabile, ai servizi igienico-sanitari e all'igiene richiederà un investimento annuale di circa 114 miliardi di dollari fino al 2030. Si tratta di una somma considerevole, ma non agire ha un costo molto più alto".

Per quanto riguarda l'Italia, nella parte di competenza del Rapporto ISTAT 2023 viene evidenziato lo stress idrico (anni 2015-2019) del distretto idrografico del Fiume Po, condizionato dal maggior prelievo per l'agricoltura rispetto agli altri distretti idrografici. Nel 2020, l'Italia si colloca al terzo posto tra i Paesi dell'Ue per il prelievo pro capite di acqua potabile (155 metri cubi annui, dopo Irlanda e Grecia). Nel 2021, il numero di comuni capoluogo di provincia e città metropolitane sottoposti a misure di razionamento dell'acqua cresce da 11 del 2020 a 15 (2 dei quali nel Centro-Nord). Nel 2020, circa 7 milioni di abitanti sono privi di servizio pubblico di fognatura comunale. Nel 2022, circa una famiglia su tre non si fida di bere l'acqua del rubinetto e quasi una su dieci lamenta irregolarità nel servizio di distribuzione dell'acqua nell'abitazione. Permangono inoltre condizioni di criticità nelle reti di distribuzione dell'acqua potabile con perdite idriche totali nelle reti comunali di distribuzione nel 2022 del 42,4% (tale quota soddisferebbe le esigenze idriche di 43,4 milioni di persone per un intero anno). Ciò significa che sempre più un occhio particolare va messo sulla prevenzione alla contaminazione delle nostre acque, a promuovere il risparmio di acqua ed a prevenire gli sprechi.

## Approfondimenti:

<https://sdgs.un.org/conferences/water2023>

<https://www.istat.it/it/files/2024/03/Report-GMA-Anno-2024.pdf>

## Festival dell'Acqua 2024

Utilitalia, la Federazione delle imprese di acqua, ambiente ed energia, ha organizzato a Firenze l'edizione 2024 del Festival dell'Acqua (24-26 settem-

bre). La manifestazione, che ha cadenza biennale, ha incluso tre giornate di riflessioni e approfondimenti con esponenti della politica, tecnici ed esperti del settore nazionale e internazionale, oltre a eventi e manifestazioni che hanno coinvolto la città di Firenze per riflettere sull'importanza di questa risorsa. Tra i temi trattati: Servizi idrici e *climate change*, Misure di adattamento e mitigazione, Riduzione perdite. Atti del Festival: <https://festivalacqua.org/atti-del-festival-2024>.

## Prossimi eventi del 2025

### European Institute of Innovation and Technology (EIT) Water Info Day, 5 marzo 2025

A Bruxelles il 5 Marzo prossimo a partire dalle 8,30 si terrà l'EIT Water Info Day, un evento ibrido organizzato nell'ambito degli European Ocean Days 2025, promossi dalla Direzione Generale per gli Affari Marittimi e la Pesca (DG MARE) della Commissione Europea.

L'incontro si concentrerà sulla presentazione del bando per la creazione di una nuova *Knowledge and Innovation Community* (KIC) dedicata ai settori idrico, marino e marittimo. L'evento, pensato per potenziali candidati come imprese, enti di ricerca, università, organizzazioni non governative, decisori politici e media attivi nel settore, offrirà un'opportunità per chi vorrà partecipare al bando e conoscere meglio l'approccio dell'EIT nella creazione di ecosistemi di innovazione sostenibili.

### World Water Day, 22 Marzo 2025 dedicato alla conservazione dei ghiacciai

Come ogni anno il 22 marzo si celebra la Giornata mondiale dell'Acqua (*World Water Day*), ricorrenza istituita dalle Nazioni Unite nel 1992 prevista all'interno delle direttive dell'Agenda 21, risultato della conferenza di Rio, per sensibilizzare l'opinione pubblica sull'importanza dell'acqua dolce e sulla situazione idrica globale. Il tema del 2025 è "La conservazione dei ghiacciai" e sottolinea la necessità di proteggere i ghiacciai, che immagazzinano e rilasciano acqua vitale per l'acqua potabile, l'agricoltura e l'energia.



## Nuova guida JRC sugli aspetti idro-morfologici dei laghi in Europa a cura del Gruppo di lavoro ECOSTAT sulla valutazione idromorfologica dei laghi

*a cura di Marzia Ciampittello  
CNR-IRSA sede di Verbania*

L'obiettivo a lungo termine della Direttiva Quadro sulle Acque (DQA-WFD; Parlamento Europeo, Consiglio dell'Unione Europea, 2000) è quello di garantire un uso sostenibile delle risorse idriche nell'Unione Europea. Ciò comporta la definizione di obiettivi che, se raggiunti, creeranno condizioni coerenti con la sostenibilità delle risorse idriche. I criteri (enunciati nell'Allegato V della DQA\_WFD), rispetto ai quali devono essere giudicati gli obiettivi, sono globalmente definiti "stato ecologico", dove il "buono stato ecologico" (GES: definito come non più di un leggero cambiamento rispetto a quello previsto in condizioni inalterate) costituisce la soglia per la sostenibilità delle risorse idriche. I criteri

includono elementi di qualità biologica (EBQ, ad esempio invertebrati, fitoplancton, pesci), elementi di qualità fisico-chimica e idromorfologica (HYMO). Ciò significa che tutti i paesi devono sviluppare metodi di valutazione idromorfologica e utilizzarli nella classificazione dello stato ecologico. Tuttavia, molti paesi non li hanno ancora sviluppati per i laghi e quelli che lo hanno fatto utilizzano un'ampia gamma di metodi diversi, la maggior parte dei quali non sono collegati ai BQE. Per superare questo problema, è stato istituito il gruppo di lavoro ECOSTAT sulla valutazione idromorfologica dei laghi per scambiare le migliori pratiche e facilitare metodi di valutazione delle caratteristiche idromorfologiche coerenti e comparabili.

Questo rapporto fornisce una guida per valutare la qualità idromorfologica dei corpi idrici lacustri, concentrando su 1) come descrivere le alterazioni idromorfologiche dei laghi e sviluppare indici HYMO, 2) quali metodi consentono la raccolta di informazioni idromorfologiche rilevanti e 3) come sviluppare metodi conformi alla DQA-WFD per l'utilizzo dell'idromorfologia nella valutazione dello stato ecologico dei laghi. Queste domande vengono affrontate non solo per i laghi naturali, ma anche per i laghi non naturali. È stato prodotto sulla base delle conoscenze e delle competenze dei contributori, nonché delle informazioni raccolte durante gli scambi con esperti incaricati dagli Stati membri dell'UE.

Sono contenute e descritte 60 metriche utili a caratterizzare gli elementi necessari per la definizione della qualità idromorfologica dei laghi. Tra



ISSN 1831-9424

### A guide for assessing the hydromorphological quality of natural and artificial lakes

Argiliev, C., Bakken, T. H., Camare, A., Ciampittello, M., Huserer, A., Koehler, R., Kollada, A., Kuitila, S., Hamejeová, D., Heyraud, N., Tsakouli, V., Turunen, J., Varga, K., Pankani, S.

2025



# News

questi elementi sono compresi quelli idrologici (ovvero la quantità e dinamica del flusso, il tempo di residenza, la connessione con i corpi idrici sotterranei) e quelli morfologici (ovvero la variazione della profondità del lago, la quantità, struttura e substrato del fondo, la struttura della riva del lago). Vengono inoltre forniti i dati necessari per il calcolo delle metriche, gli strumenti e le tecniche per acquisirli (es. rilievo sul campo, modelli, telerilevamento etc.), unitamente ad esempi della loro applicazione. Sono presenti anche consigli su come definire le condizioni di riferimento e combinare i parametri per sviluppare un indice idromorfologico dei laghi conforme alla DQA-WFD.

Nella sezione finale, è stata riportata una breve rassegna bibliografica recente inerente ai legami tra idromorfologia e biologia.

European Commission: Joint Research Centre, ARGILLIER, C., BAKKEN, T.H., CARRIERE, A., CIAMPITIELLO, M., HUSSNER, A., KOEHLER, R., KOLADA, A., KUTYLA, S., NEMEJCOVA, D., REYNAUD, N., TSIAOUSSI, V., TURUNEN, J., VARTIA, K. and POIKANE, S., A guide for assessing the hydromorphological quality of natural and artificial lakes, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2025,  
<https://data.europa.eu/doi/10.2760/2602647>, JRC141034

## Progetto MIA Rete Natura 2000

### Individuati “nuovi” habitat e specie vegetali lungo i fiumi pugliesi

Giuseppe Pappagallo, Emanuele Barca, *CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Bari*

Marco Barcella, *Botanico, libero professionista.*

Nel 2021, in occasione dell'aggiornamento periodico dei piani di monitoraggio di habitat e specie di interesse comunitario previsto dalla Direttiva Habitat (92/43/CEE - DH), CNR-IA e CNR-IRSA, con i gruppi di Bari, Brughiero e Taranto, hanno risposto alla call per la Selezione di Azioni di Monitoraggio della Rete Natura 2000 pubblicata dalla Sezione Tutela e Valorizzazione del Paesaggio della Regione Puglia (DGR n. 150/2020; POR 2014-2020) proponendo il progetto **MIA Rete Natura 2000**.

In questo articolo vengono presentati alcuni risultati raggiunti nell'ambito della Task n. 3 del progetto, denominata “Habitat fluviali”, finalizzata all'osservazione e alla valutazione dello stato di conservazione dei corsi d'acqua di tipo mediterraneo censiti dalla Regione Puglia (DGR 2442/2018 - “Rete Natura 2000. Individuazione di Habitat e Specie

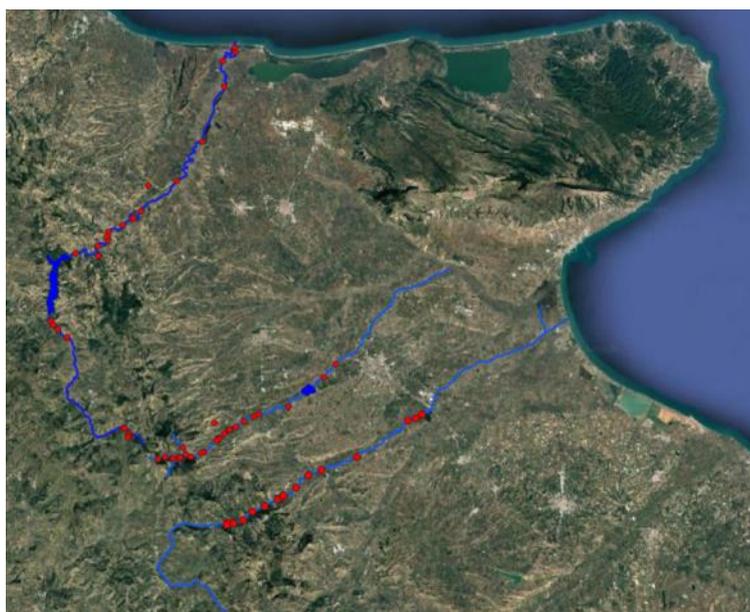
vegetali e animali di interesse comunitario nella Regione Puglia”) e menzionati come habitat di interesse comunitario con le seguenti denominazioni:

- **Habitat 3250** - Fiumi mediterranei a flusso permanente con *Glaucium flavum* (Fig. 2);
- **Habitat 3280** - Fiumi mediterranei a flusso permanente con vegetazione dell'alleanza *Paspalo-Agrostidion* e con filari ripari di *Salix* e *Populus alba* (Fig. 3);
- **Habitat 3290** - Fiumi mediterranei a flusso intermittente con il *Paspalo-Agrostidion* (Fig. 4).

La proposta avanzata, oltre all'aggiornamento dei piani di monitoraggio, ne prevedeva l'ampliamento mediante l'integrazione dei rilievi sensu Direttiva Habitat con quelli previsti dalla Direttiva Acque (2000/60/CEE - WFD), attraverso la contestuale applicazione del metodo CARA-

VAGGIO (Buffagni et al., 2013).

L'attenzione si è focalizzata su questa categoria di habitat perché negli ambienti aridi e semiaridi, in particolare, essi svolgono un ruolo strategico, fornendo servizi ecosistemici di fondamentale importanza: ricchezza di biodiversità, qualità del paesaggio, fornitura di acqua per uso irriguo e potabile, sequestro di CO<sub>2</sub>, assorbimento di nutrienti e inquinanti, mitigazione del clima, ecc. (Pastor et al., 2022). Inoltre, i fiumi della regione mediterranea sono caratterizzati da un regime prevalentemente intermittente che li rende particolarmente esposti agli effetti del ri-



**Figura 1.** Siti di campionamento lungo Fortore, Celone e Cervaro (da N a S).

# Progetti

scaldamento globale. Le diverse fasi idrologiche che li caratterizzano (*flow; connected-pools; disconnected-pools; dry*), infatti, presentano un delicato equilibrio nella loro alternanza stagionale dal quale dipende il succedersi e la sopravvivenza delle diverse comunità animali e vegetali

che popolano questi habitat (De Girolamo et al., 2015). Il cambiamento climatico e l'estremizzazione degli eventi meteorologici ad esso associati stanno alterando questo equilibrio, favorendo il prevalere delle fasi idrologiche estreme e, quindi, la sopravvivenza soltanto di alcune comunità biologiche, mettendo a rischio l'integrità degli habitat e degli ecosistemi che da essi dipendono (Kougioumoutzis et al., 2020).

Il piano sperimentale della Task n. 3 ha previsto come aree di studio i fiumi Fortore, Celone e Cervaro, ubicati a nord-ovest della regione, nel territorio compreso fra i Monti Dauni e la Piana del Tavoliere (Fig. 1), ritenuti particolarmente idonei alla ricerca condotta per la presenza di diversi Siti di Interesse Comunitario, Zone di Protezione Speciale e Zone Speciali di Conservazione, oltre a quella di due invasi con funzione potabile e irrigua (Occhito sul Fortore e San Giusto sul Celone).



**Figura 2.** Habitat 3250 presso T. Cervaro

Nel corso delle attività di monitoraggio, iniziate ad aprile 2022 e concluse a giugno 2024, sono stati investigati complessivamente 80 siti (31 lungo il fiume Fortore, 31 sul torrente Celone e 18 lungo il Cervaro) ed eseguiti 57 rilievi (22 - Fortore, 19 - Celone e 16 - Cervaro) (Fig. 1).

Per l'esecuzione dei rilievi si è fatto riferimento alle Linee Guida dell'UE (Evans & Arvela, 2011), recepite da ISPRA nel Manuale 142/2016, *Monitoraggio di habitat di interesse comunitario* (Angelini et al., 2016), il quale per habitat come quelli da noi considerati, ovvero definiti da precisi riferimenti floristici e sintassonomici, prevede che la classificazione si basi prevalentemente sull'analisi della componente vegetazionale poiché da essa dipendono le caratteristiche strutturali e funzionali degli habitat. In particolare, per lo studio delle formazioni vegetali il manuale propone il metodo fitosociologico di Braun-Blanquet (1932), basato sul censimento e la registrazione dei dati di presenza e abbondanza delle singole specie rilevate all'interno dei plot di campionamento (di 4x4 m, nel nostro caso), ritenuti



**Figura 3.** Habitat 3280 presso T. Celone

# Progetti

rappresentativi delle stazioni esaminate, secondo una specifica scala imposta sui seguenti indici di copertura: **r**, *individui isolati con bassi valori di copertura*; **+**, *copertura < 1 %*; **1**, *copertura = 1-5 %*; **2**, *copertura = 5-25 %*; **3**, *copertura = 25-50 %*; **4**, *copertura = 50-75 %*; **5**, *copertura > 75 %*.

Questo procedimento, dopo opportuno trattamento statistico delle informazioni, offre il vantaggio di favorire il confronto fra dati temporali e stazionali differenti, permettendo una precisa identificazione delle comunità rilevate ed al tempo stesso un'efficace analisi delle relazioni vegetazione-ambiente (Chytrý et al, 2016).

Tuttavia, durante i sopralluoghi si è provveduto anche al rilievo di altri importanti fattori ambientali, quali natura del substrato, caratteristiche topografiche e/o geomorfologiche, componente faunistica, analisi delle minacce e delle pressioni, qualità delle acque, ecc.

Al termine delle tre stagioni di rilevamento (2022, 2023 e 2024) i dati raccolti sono stati sottoposti a *cluster analysis*, al fine di ottenere le informazioni necessarie per la classificazione cenologica e sintassonomica dei siti monitorati e, quindi, la definizione della tipologia e dello stato di conservazione degli habitat presenti.



**Figura 4.** Habitat 3290 presso F. Fortore

Lo spettro biologico che ne è derivato ha evidenziato la prevalenza delle emicriptofite, che nell'insieme delle forme scapose, bienni, cespitose rosulate e scandenti costituiscono circa il 44% delle specie identificate. Queste sono seguite dalle terofite con circa il 15% della flora rilevata. Interessante anche l'elevata presenza di geofite, che rappresentano il 12% delle specie censite.

Lo spettro corologico, invece, ha dimostrato la prevalenza di specie ad ampia distribuzione come Paleotemperate, Eurasiatiche, Circumboreali, Eurosiberiane, Subcosmopolite e Cosmopolite, che rappresentano circa il 50% delle specie identificate. Viceversa, le specie alloctone sono solo 9, dato che conferma un buono stato di conservazione complessivo della flora. Interessante la presenza di due specie endemiche.

Dal punto di vista fitosociologico, le 144 unità tassonomiche censite e gli indici di copertura ad esse associati, hanno portato al riconoscimento di 7 tipi vegetazionali: *Chenopodium rubri*; *Epilobietalia Glaucion flavi*; *Paspalo-Agrostion verticillati*; *Petasi-*

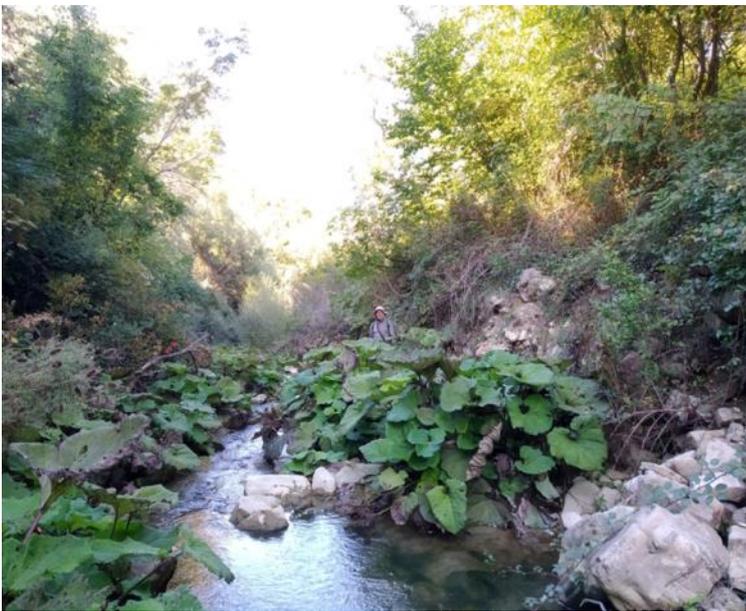


**Figura 5** Habitat 3270 presso T. Cervaro

# Progetti

*tion officinalis; Prunetalia spinosae; Salici purpureae-Populetea nigrae.*

Si è giunti così all'identificazione, nel complesso, di 6 diversi tipi di habitat: 4 fluviali (H3250, H3270, H3280 e H3290) (Figg. 2-5, 1 di prateria umida (H6430) (Fig. 6) e 1 forestale (H92A0) (Fig. 7).



**Figura 6.** Habitat 6430. Formazione a megaforbie presso T. Celone

In sintesi, quindi, è stata confermata la presenza degli habitat fluviali attesi (H3250, H3280 e H3290) (Figg. 2-4), e, elemento di particolare rilievo, è emersa anche la presenza di habitat non ancora segnalati in Puglia, ovvero **H3270 - Fiumi con argini melmosi con vegetazione del *Chenopodium rubri p.p* e *Bidenton p.p*** (Fig. 5) e **H6430 - Bordure planiziali, montane e alpine di megaforbie idrofile**. (Fig. 6). Presenza, quest'ultima, particolarmente interessante perché rinvenuta lungo il corso di torrenti a regime idrologico tipicamente intermittente (Celone e Cervaro).

Ulteriore conferma dell'importanza ecologica e conservazionistica dell'individuazione di questi habitat è data dal rinvenimento al loro interno di alcune specie indicatrici non ancora segnalate in Puglia, in particolare ***Angelica sylvestris* L.** (Fig. 8) e ***Salix eleagnos* Scop.** (Fig. 9), come è riportato sia dal **Portale della Flora d'Italia** ([https://floritaly.plantdata.it/index.php?procedure=taxon\\_page&tipo=all&id=221](https://floritaly.plantdata.it/index.php?procedure=taxon_page&tipo=all&id=221); [https://floritaly.plantdata.it/index.php?procedure=taxon\\_page&tipo=all&id=3606](https://floritaly.plantdata.it/index.php?procedure=taxon_page&tipo=all&id=3606)) sia da VEGITALY, il progetto curato dalla Società Italiana di Scienze della Vegetazione (SISV) (<http://www.anarchive.it/anArchive/specie/dettagli.jsp?id=34269>; <http://www.anarchive.it/anArchive/specie/dettagli.jsp?id=25519>).



**Figura 7.** Habitat 92A0. Galleria di pioppi e salici, presso F. Fortore

In conclusione, le attività di monitoraggio degli habitat fluviali pugliesi condotte nell'ambito del progetto regionale *MIA Rete Natura 2000*, hanno confermato il ruolo strategico svolto in ambiente mediterraneo dai corsi d'acqua intermittenti, evidenziandone l'importanza floristica ed ecologica, oltre a quella economica e sociale. La presenza di molteplici habitat con caratteristiche vegetazionali differenti in termini di composizione, struttura ed ecologia, conferma il loro elevato indice di biodiversità. Tale ricchezza biologica dovrebbe richiamare l'attenzione degli enti preposti all'attuazione di tutte le norme di salvaguardia previste per questi corsi d'acqua, dal cui fragile equilibrio dipende la sopravvivenza di delicati ecosistemi e degli importanti servizi da

# Progetti

essi offerti, soprattutto in un contesto di cambiamento climatico.

Ringraziamo Stefania Erba, Andrea Buffagni e Marcello Cazzola per il contributo scientifico e Pompilio Vergine per il supporto organizzativo.



**Figura 8.** *Angelica sylvestris* L. presso T. Celone



**Figura 9.** *Salix eleagnos* Scop. presso T. Cervaro

## Bibliografia essenziale

Angelini P., Casella L., Grignetti A., Genovesi P. Manuali per il monitoraggio di specie e habitat di interesse comunitario (Direttiva 92/43/CEE) in Italia: habitat. ISPRA, Serie Manuali e linee guida, 142/2016

Buffagni A., D. Demartini & L. Terranova. Manuale di applicazione del Metodo CARAVAGGIO – Guida al Riconoscimento e alla descrizione degli habitat fluviali. IRSA-CNR, Roma, 1/i, 2003.

Chytrý M., Otýpková Z. Plot sizes used for phytosociological sampling of European vegetation. *Journal Vegetation Science* 14: 563-570, 2003.

De Girolamo A.M., Gallart F., Pappagallo G., Santese G., Lo Porto A. An eco-hydrological assessment method for temporary rivers. The Celone and Salsola rivers case study (SE, Italy). *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 51 (1) 1-10, 2015.

Evans, D., Arvela, M. Assessment and Reporting under the Habitats Directive. European Topic Centre on Biological Diversity. Paris, France. 2011.

Kougioumoutzis K, Kokkoris IP, Panitsa M, Trigas P, Strid A, Dimopoulos P. Plant Diversity Patterns and Conservation Implications under Climate-Change Scenarios in the Mediterranean: The Case of Crete (Aegean, Greece). *Diversity*.12(7):270, 2020.

Pastor A.V., Tzoraki O., Bruno D., T. Kaletová T., Mendoza-Lera C., Alamanos A., Brummer M., Datry T., De Girolamo A.M.. Rethinking ecosystem service indicators for their application to intermittent rivers. *Ecological Indicators*, 137, 2022.

Tesi di Dottorato in “Processi Chimici per l’Industria e per l’Ambiente “ (XXXVII Ciclo) - Univ. Sapienza - Roma

a cura di Marco Resitano, Supervisione di Federico Aulenta, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque, Sede di Roma - Montelibretti

1/2025

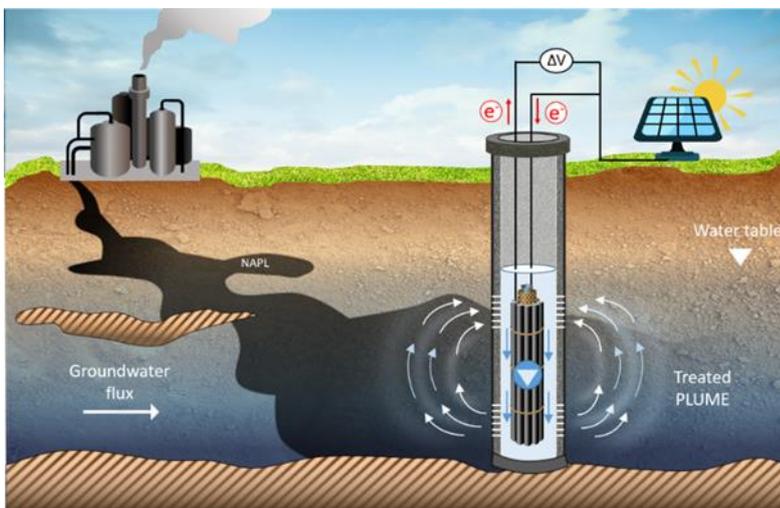
Questa tesi di dottorato ha riguardato l’applicazione di tecnologie elettrochimiche microbiche (MET) per il biorisanamento di acque sotterranee contaminate da idrocarburi petroliferi, solventi clorurati e metalli pesanti. Queste tecnologie, negli ultimi anni, hanno attirato crescente attenzione nel campo della bonifica di suoli e falde acquifere, poiché, a differenza dei metodi convenzionali, possono consentire un trattamento più efficace e sostenibile ed un maggiore controllo sui processi di biodegradazione di un ampio spettro di inquinanti organici ed inorganici (Aulenta et al., 2010; Daghighi et al., 2017; Feng et al., 2023; Leitão et al., 2015; Wang et al., 2020).

I sistemi bioelettrochimici sfruttano elettrodi come accettori e/o donatori di elettroni nel metabolismo microbico, favorendo l’ossidazione dei contaminanti ridotti sull’anodo e la riduzione dei composti ossidati sul catodo. Un vantaggio di questi sistemi è la possibilità di utilizzare gli elettrodi come fonte inesauribile di elettroni, rendendo possibile la degradazione di diversi tipi di contaminanti senza l’aggiunta di composti chimici esterni. Inoltre, possono consentire la co-localizzazione di accettori e donatori di elettroni con i microrganismi aderenti al biofilm lungo l’elettrodo, migliorando l’efficienza del processo di rimozione biologica dei contaminanti. (Li and Yu, 2015; Saxena et al., 2020; Wang et al., 2020). Un ulteriore aspetto innovativo è la possibilità di monitorare da remoto il processo di degradazione tramite la misura del flusso di elettroni, fornendo così informazioni, in tempo reale, sulle cinetiche di trattamento e sull’efficacia della bonifica. Mentre i principali limiti da superare possono riguardare; la mancanza di configurazioni scalabili adeguate ad un trattamento in-situ, la carenza di test di biodegradazione condotti in condizioni che siano fedeli a quelle reali di situazioni di contaminazione, l’alto costo dei materiali utilizzati. Proprio per superare le criticità dei sistemi bioelettrochimici, recentemente, è stato

sviluppato il prototipo di “Bioelectric Well”, un sistema idoneo al trattamento in-situ (Figura 1). Partendo proprio da questo prototipo, la tesi si è concentrata sulla verifica e sull’estensione dell’applicabilità delle tecnologie di elettrobioremediation per il trattamento di complessi scenari di contaminazione delle acque di falda.

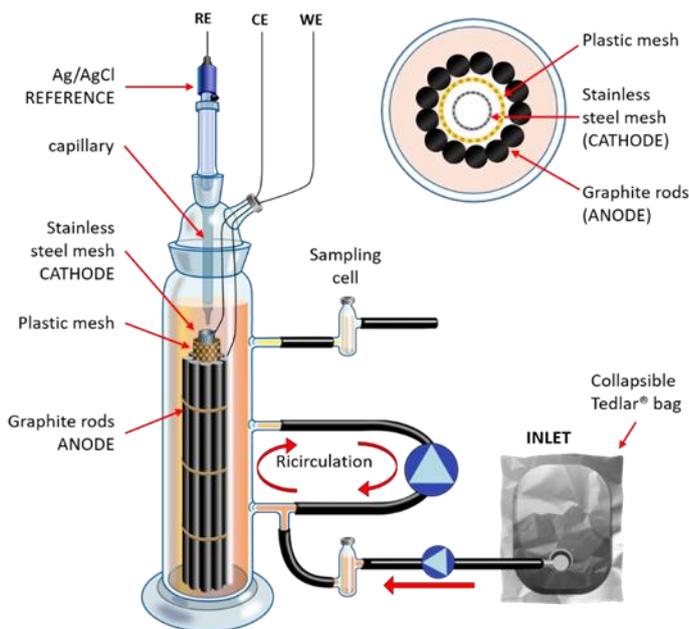
La tesi è stata sviluppata in cinque diversi studi, ciascuno focalizzato sulla caratterizzazione e lo sviluppo di sistemi MET progettati per migliorare l’efficienza di rimozione di contaminanti sfruttando contemporaneamente processi ossidativi e riduttivi.

L’obiettivo del primo studio ha riguardato l’ottimizzazione delle prestazioni del reattore (Figura 2) a diversi range di concentrazione del toluene in ingresso, ha esplorato i meccanismi di degradazione elettrogenica del toluene, un idrocarburo petrolifero scelto come modello, ed il ruolo di processi di interazione simbiotica tra i microrganismi in grado di biodegradare questo contaminante. Attraverso operazioni in flusso



**Figura 1.** Illustrazione di un prototipo di reattore bioelettrochimico tubolare, denominato "Bioelectric Well", per il trattamento *in situ* di acque di falda contaminate.

concentrazione del toluene in ingresso, ha esplorato i meccanismi di degradazione elettrogenica del toluene, un idrocarburo petrolifero scelto come modello, ed il ruolo di processi di interazione simbiotica tra i microrganismi in grado di biodegradare questo contaminante. Attraverso operazioni in flusso



**Figura 2.** Rappresentazione schematica del reattore bioelettrochimico operato a flusso continuo, in configurazione a tre elettrodi (WE: elettrodo di lavoro composto da una corona di bacchette di grafite, CE: contro-elettrodo in posizione concentrica composto da una maglia in acciaio inossidabile, RE: elettrodo di riferimento in Ag/AgCl).

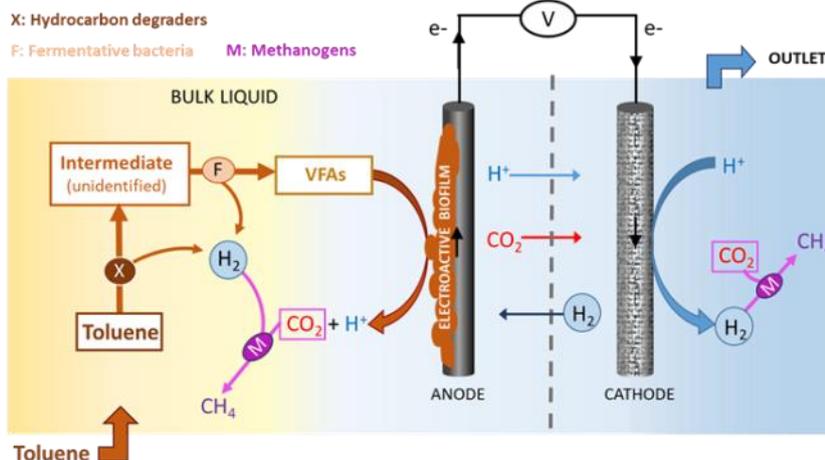
continuo con diverse concentrazioni di influente, è stato proposto un meccanismo di degradazione sintrofica che ha coinvolto la rottura dell'anello aromatico e la successiva conversione degli intermedi metabolici in acidi grassi volatili (VFAs) (Figura 3). L'anodo è stato continuamente polarizzato a +0,2 V vs. SHE. In queste condizioni, il tasso massimo di rimozione del toluene ha raggiunto il valore di  $71 \pm 13 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , con una degradazione media della concentrazione in ingresso di circa il 70%. L'analisi della comunità microbica ha suggerito un'interazione cooperativa tra, batteri capaci di degradare gli idrocarburi, batteri fermentativi e microrganismi elettroattivi, evidenziando come le interazioni sintrofiche possano essere fondamentali per un'ottimale degradazione dei contaminanti (Tucci et al., 2022).

Il secondo ed il terzo studio hanno esplorato la possibilità di biodegradare simultaneamente contaminanti ossidabili e riducibili, in un unico ambiente di reazione. Nel dettaglio, il secondo studio ha riguardato il trattamento simultaneo di

una miscela sintetica di toluene e tricloroetilene (TCE) utilizzando il reattore bioelettrochimico tubolare precedentemente sviluppato. L'anodo, polarizzato a +0,2 V vs. SHE, ha consentito tassi di degradazione di  $150 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  per il toluene e  $500 \mu\text{eq L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  per il TCE. L'anodo di grafite polarizzato ha promosso efficacemente l'ossidazione del toluene, generando una corrente elettrica significativa che ha a sua volta sostenuto, tramite la produzione abiotica di idrogeno molecolare, la riduzione biologica del TCE a intermedi meno clorurati, come cis-DCE e VC. L'analisi filogenetica della comunità microbica del reattore ha evidenziato il potenziale funzionale sia per quanto riguarda i processi di ossidazione anaerobica del toluene sia per la dechlorazione riduttiva del TCE, evidenziando la capacità del sistema di trattare più

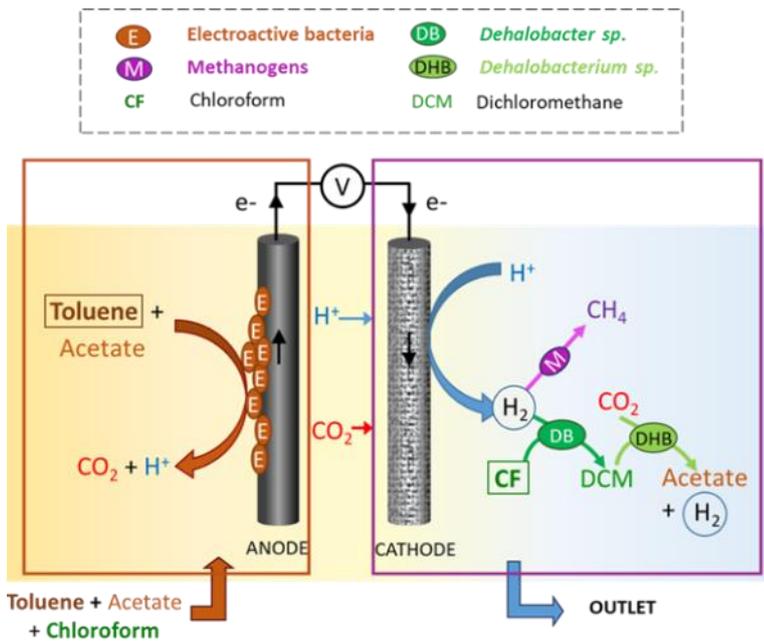
contaminanti contemporaneamente (Cruz Viggì et al., 2022).

Il terzo studio (Figura 4) ha esplorato la degradazione simultanea di toluene e cloroformio in un reattore bioelettrochimico anaerobico. I risultati hanno dimostrato un'efficace rimozione di entrambi i contaminanti, con tassi massimi di degradazione di  $47 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  per il toluene e  $60 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  per il cloroformio, quando l'anodo era polarizzato a +0,4 V vs. SHE. Tuttavia, la presenza di acetato come co-substrato ha mostrato effetti di inibizione competitiva sulla degradazione del toluene, evidenziando la complessità delle strategie di



**Figura 3.** Schema del meccanismo proposto di degradazione bioelettrochimica del toluene nel reattore polarizzato operato a flusso continuo.

# Dottorati



**Figura 4.** Schema del meccanismo proposto di biodegradazione di toluene e acetato tramite ossidazione all'anodo e degradazione del cloroformio al catodo.

biorisanamento in presenza di contaminanti multipli (Tucci et al., 2023).

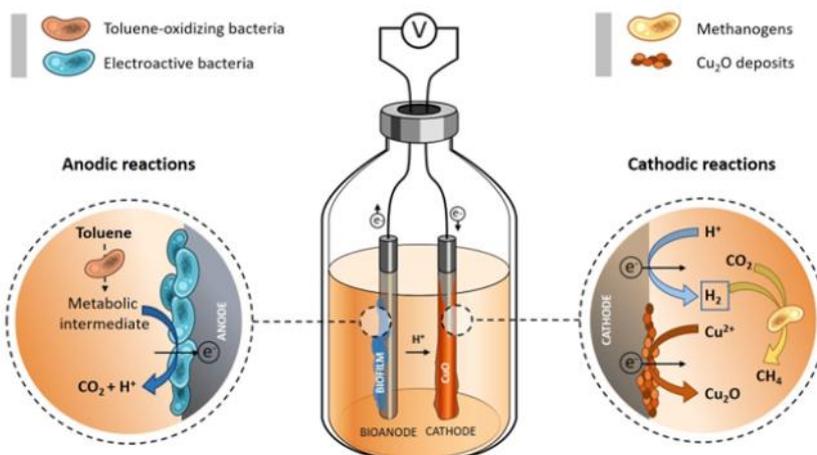
Nel quarto studio abbiamo esplorato la possibilità di accoppiare le due reazioni di ossidazione e riduzione, rispettivamente, per la rimozione del toluene e la rimozione del possibile recupero del rame, un composto inorganico metallico (Figura 5). È stata osservata una rimozione quasi completa di entrambi i contaminanti sfruttando la corrente elettrica generata dall'ossidazione del toluene all'anodo per guidare la riduzione abiotica e la precipitazione del rame al catodo. Le caratterizzazioni chimiche e microbiologiche dettagliate hanno rivelato un biofilm anodico robusto, capace di una biodegradazione efficace, insieme a una deposizione uniforme di nanoparticelle di  $\text{Cu}_2\text{O}$  sul catodo (Resitano et al., 2024).

Infine, il quinto studio ha indagato la combinazione innovativa di sistemi bioelettrochimici con membrane conduttive composte da nanotubi di carbonio, per il trattamento delle acque contaminate da nitrati.

Questo approccio ha permesso la simultanea filtrazione e biodegradazione dei contaminanti, portando a un'efficace riduzione dei nitrati senza accumulo di nitriti. Le proprietà elettroattive delle membrane hanno permesso l'applicabilità di una corrente elettrica, garantendo tassi stabili di rimozione dei nitrati superiori a  $900 \text{ mg N/m}^2\text{d}$ .

Nel complesso, questa tesi ha esplorato l'efficacia delle tecnologie di elettrobiorisanamento per la bonifica delle acque sotterranee contaminate da

complesse miscele, dimostrando la loro versatilità e il loro potenziale per un risanamento sostenibile. Per favorire la transizione di queste tecnologie dalla scala di laboratorio a quella di campo, sarà fondamentale ottimizzare il design del reattore, il materiale degli elettrodi ed i parametri operativi, per migliorare l'efficienza e ridimensionare i costi. Sarebbe fondamentale effettuare test sul campo su larga scala (TRL 5 o superiore) per dimostrare la validità e la robustezza del processo in condizioni altamente rappresentative, oltre che per stimolare l'interesse di potenziali stakeholders nei confronti di tali tecnologie.



**Figura 5.** Schema del meccanismo proposto di trattamento bioelettrochimico di un'acqua di falda co-contaminata da toluene e rame

## Bibliografia

- Aulenta, F., Reale, P., Canosa, A., Rossetti, S., Panero, S., Majone, M., 2010. Characterization of an electro-active biocathode capable of dechlorinating trichloroethene and cis-dichloroethene to ethene. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1796–1802. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2009.12.033>
- Cruz Viggì, C., Tucci, M., Resitano, M., Crognale, S., Di Franca, M.L., Rossetti, S., Aulenta, F., 2022. Coupling of bioelectrochemical toluene oxidation and trichloroethene reductive dechlorination for single-stage treatment of groundwater containing multiple contaminants. *Environ. Sci. Ecotechnol.* 11, 100171. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2022.100171>
- Daghio, M., Aulenta, F., Vaiopoulou, E., Franzetti, A., Arends, J.B.A., Sherry, A., Suárez-Suárez, A., Head, I.M., Bestetti, G., Rabaey, K., 2017. Electrobioremediation of oil spills. *Water Res.* 114, 351–370. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.030>
- Feng, H., Yang, W., Zhang, Y., Ding, Y., Chen, L., Kang, Y., Huang, H., Chen, R., 2023. Electroactive microorganism-assisted remediation of groundwater contamination: Advances and challenges. *Bioresour. Technol.* 377, 128916. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2023.128916>
- Leitão, P., Rossetti, S., Nouws, H.P.A., Danko, A.S., Majone, M., Aulenta, F., 2015. Bioelectrochemically-assisted reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane by a Dehalococcoides- enriched microbial culture. *Bioresour. Technol.* 195, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.027>
- Li, W.W., Yu, H.Q., 2015. Electro-assisted groundwater bioremediation: Fundamentals, challenges and future perspectives. *Bioresour. Technol.* 196, 677–684. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.07.074>
- Resitano, M., Tucci, M., Mezzi, A., Kaciulis, S., Matturro, B., D'Ugo, E., Bertuccini, L., Fazi, S., Rossetti, S., Aulenta, F., Viggì, C.C., 2024. Anaerobic treatment of groundwater co-contaminated by toluene and copper in a single chamber bioelectrochemical system. *Bioelectrochemistry* 158, 108711. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECTCHEM.2024.108711>
- Saxena, G., Thakur, I.S., Kumar, V., Shah, M.P., 2020. Electrobioremediation of Contaminants: Concepts, Mechanisms, Applications and Challenges. *Comb. In: Shah, M., Banerjee, A. (eds) Combined Application of Physico-Chemical & Microbiological Processes for Industrial Effluent Treatment Plant.* Springer, Singapore, 291–313. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0497-6\\_14/TABLES/2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0497-6_14/TABLES/2)
- Tucci, M., Fernández-Verdejo, D., Resitano, M., Ciacia, P., Guisasola, A., Blánquez, P., Marco-Urrea, E., Viggì, C.C., Matturro, B., Crognale, S., Aulenta, F., 2023. Toluene-driven anaerobic biodegradation of chloroform in a continuous-flow bioelectrochemical reactor. *Chemosphere* 338, 139467. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139467>
- Tucci, M., Milani, A., Resitano, M., Viggì, C.C., Giampaoli, O., Miccheli, A., Crognale, S., Matturro, B., Rossetti, S., Harnisch, F., Aulenta, F., 2022. Syntrophy drives the microbial electrochemical oxidation of toluene in a continuous-flow 'bioelectric well'. *J. Environ. Chem. Eng.* 10, 107799. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107799>
- Wang, X., Aulenta, F., Puig, S., Esteve-Núñez, A., He, Y., Mu, Y., Rabaey, K., 2020. Microbial electrochemistry for bioremediation. *Environ. Sci. Ecotechnology* 1, 100013. <https://doi.org/10.1016/J.ESE.2020.100013>

## Valorizzazione di rifiuti organici urbani e bioplastiche per la produzione di acidi carbossilici ad alto valore aggiunto

Tesi di Laurea in Chimica Analitica - Univ. Sapienza - Roma  
a cura di Emiliano di Censo

**Relatore:** Prof.ssa A. L. Capriotti, Dip. Chimica, Sapienza Università di Roma

**Relatore esterno:** Dott.ssa Camilla M. Braguglia (CNR-IRSA, Sede di Roma - Montelibretti)

La tesi si inserisce nel contesto dello sviluppo di un processo biotecnologico sostenibile, finalizzato alla valorizzazione degli scarti organici urbani mediante la produzione di bio-composti di interesse commerciale. In particolare, lo studio si concentra sull'analisi di tre flussi tipici di rifiuti urbani biodegradabili: gli scarti alimentari, che costituiscono circa il 70% della Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani (FORSU), le bioplastiche compostabili associate (tipicamente buste per la raccolta dell'umido, posate e bicchieri) e i fanghi di depurazione delle acque reflue. Questi rifiuti sono stati utilizzati come materie prime per la produzione di acidi grassi a catena media, con un focus particolare sull'acido caproico (C6), tramite due vie metaboliche anaerobiche consecutive: la fermentazione acidogenica e la "chain elongation" (CE). La *chain elongation* è un processo ciclico di allungamento della catena carbossilica, che avviene grazie alla presenza di un donatore di elettroni (lattato, etanolo) tramite una reazione di  $\beta$ -ossidazione inversa. Nel caso degli acidi con un numero pari di atomi di carbonio, a partire da acido acetico si ottiene acido butirrico, quindi acido caproico da butirrico nel ciclo successivo.

L'acido caproico è uno dei composti più promettenti tra gli acidi carbossilici, con numerose applicazioni industriali, tra cui l'impiego come agente antibatterico, additivo alimentare, plastificante, lubrificante e tensioattivo ed ha un valore di 3000 \$/tonnellata. Nonostante la grande richiesta, ad oggi la sua produzione è quasi totalmente a carico di fonti fossili o estratto da grassi animali e oli vegetali e la sua produzione da scarti attraverso questo processo biotecnologico potrebbe rappresentare una risorsa strategica per la sostenibilità ambientale ed economica.

L'obiettivo principale della ricerca è stato quello di esplorare le condizioni operative ottimali per un processo a singolo stadio che consenta l'uso simultaneo delle due vie metaboliche, riducendo i costi e migliorando l'efficienza. L'approccio proposto mira ad evitare l'utilizzo di agenti tampone, comunemente impiegati in grandi quantità nei processi di CE, grazie alla capacità dei fanghi di svolgere un ruolo tamponante nel controllo del pH. Nello stesso tempo si è voluto eliminare la necessità di aggiungere dall'esterno il lattato come donatore di elettroni, sfruttando il potenziale fermentativo di zuccheri e proteine presenti negli scarti alimentari per produrlo direttamente in situ. È stato investigato anche l'impiego del lattato recuperato da rifiuti di bioplastica in PLA (acido polilattico), esplorando l'impatto di questo nuovo percorso di riciclo sulla produzione di acidi grassi a catena media.



Figura 1. Reattore CSTR da 5,5 L.

Le prove condotte in modalità batch hanno permesso di valutare l'effetto del rapporto tra scarti alimentari e fanghi nella miscela da trattare e l'efficacia di un pretrattamento termico in autoclave ( $T=134^{\circ}\text{C}$ ,  $p=3.2$  bar,  $t=20$  min). Le analisi hanno identificato le condizioni ottimali per avviare successivamente il processo in modalità semicontinua con un reattore da 5,5 Litri (Figura 1).

In particolare, un rapporto pari a 60/40 (scarti alimentari/fanghi su base solidi volatili) è risultato favorevole per garantire un apporto adeguato di zuccheri, necessari per la produzione di lattato, e per assicurare una quantità sufficiente di fango per mantenere il pH a valori ottimali senza richiedere l'aggiunta di agenti tamponanti. Il pretrattamento termico si è rivelato vantaggioso in quanto aumenta la solubilità delle proteine del fango che grazie alla successiva produzione di  $\text{NH}_4$ , aumentano il potere tamponante del sistema nonché la stabilità del processo.

Il lattato prodotto in situ dalla fermentazione primaria degli zuccheri solubili



**Figura 2.** Cromatogramma di un campione di digestato per quantificare i VFA tramite GC Agilent 8860 (in alto) e distribuzione percentuale degli stessi durante la prova (in basso)

prontamente disponibili è stato efficacemente consumato durante il processo di CE, con la produzione di acido caproico, mantenuta stabile a valori di conversione medi del 22,5% della sostanza organica alimentata tramite rifiuti. L'acido caproico è risultato il primo acido per abbondanza percentuale (Figura 2) con il 30%, seguito da acido acetico (29%) e acido butirrico (25%).

Oltre agli ottimi risultati ottenuti con il test in semicontinuo, lo studio ha dimostrato che il lattato recuperato dalle bioplastiche in PLA (Figura 3) può essere efficacemente utilizzato come donatore di elettroni per la produzione di acido caproico, contribuendo a migliorare ulteriormente l'efficienza del processo.

È stata condotta infine un'analisi tecno-economica preliminare per valutare la potenziale redditività della conversione di rifiuti organici urbani misti in acido caproico. L'analisi ha considerato la quantità di frazione organica raccolta dai rifiuti solidi urbani in città come Roma (180.000 tonnellate di scarti alimentari di cucine e mense e 170.000 tonnellate annue di fango nel 2023) nonché i costi e benefici associati alla produzione di acido caproico e biometano. Il recupero e la purificazione dell'acido caproico comportano costi significativi, ma la vendita garantirebbe comunque ricavi netti fino a quasi 8 milioni di euro l'anno. L'approccio di bioraffineria proposto risulta vantaggioso rispetto alla digestione anaerobica tradizionale, che garantirebbe un potenziale profitto netto di circa 4,81 milioni di euro all'anno. Sebbene i ricavi siano promettenti, è necessario un approfondimento sui costi operativi e sulle rese per garantire la sostenibilità economica su scala industriale.

Il recupero e la valorizzazione dei rifiuti biodegradabili, come fanghi e scarti alimentari, costituiscono una parte cruciale delle politiche ambientali dell'Unione Europea, mirando a ridurre l'impatto della gestione dei rifiuti e le emissioni di gas serra, in linea con gli obiettivi di economia circolare e sostenibilità ambientale.

L'impiego di questi rifiuti come materie prime rinnovabili per la produzione di acido caproico contribuisce alla conservazione delle risorse naturali, riducendo la domanda di risorse limitate. Inoltre, l'uso di fanghi come fonte tampone consente di evitare l'impiego di agenti chimici, che comportano un impatto ambientale significativo, in particolare per il consumo di energia durante i processi di produzione. L'adozione di pratiche di gestione sostenibile dei rifiuti, come la riduzione e la valorizzazione, offre numerosi benefici per l'ambiente e la salute umana, ma la valutazione dei trade-off ambientali in questi sistemi complessi rappresenta una sfida che necessita di ulteriori approfondimenti.

### PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

Sbicego M., Gallipoli A., Frugis A., Gianico A., Lazzazzara M., Di Censo E., Angelini F., Angelini S., Cecchini G., Braguglia C.M., 2025. *Sustainable anaerobic conversion of urban organic waste through lactate-driven chain elongation and anaerobic digestion into marketable carboxylic acids and energy: an urban biorefinery*. In: 12<sup>th</sup> Int. Conf. Sustainable Solid Waste Management Paphos, Cyprus, 25-28 June 2025.



**Figura 3.** Filtro di camomilla in PLA prima (a sinistra) e dopo (a destra) il pretrattamento termico

# Eventi

1/2025

## RemTech Europe

Ferrara, 15-19 settembre 2025

RemTech Europe, la conferenza internazionale sulle ultime tendenze nell'ambito del recupero ambientale, quest'anno è in programma dal 15 al 19 Settembre 2025. I primi due giorni della conferenza (15-16 settembre) saranno completamente digitali e trasmessi in streaming mentre le altre giornate (17-19 settembre) saranno ibride, in presenza a Ferrara Fiere e trasmesse anche online.

Lo scopo della Conferenza (in lingua inglese) è condividere informazioni su conoscenze, innovazione e *case histories*, incoraggiare lo sviluppo di processi di bonifica e l'applicazione di tecnologie nuove e sostenibili e riunire esperti e fornitori di servizi e tecnologie disponibili.

RemTech Europe è soprattutto una piattaforma di discussione tra i diversi stakeholder europei ma è aperto a tutti gli altri continenti. L'agenda è molto ricca (comprende una sessione LIVE DEMO e vari TRAINING COURSES) per condividere le conoscenze tra tutte le figure coinvolte.

La partecipazione è completamente gratuita per gli enti di ricerca e governativi.

E' aperta la *Call for Abstract* (deadline: 31 Marzo 2025): <https://remtechexpo.com/remtech-europe>

RemTech Europe ospiterà anche "Sustainathon 2025" tra il 24 e il 25 settembre 2025 (<https://remtechexpo.com/sustainathon>), una maratona di 24 ore di relatori provenienti da tutto il mondo ci illustreranno gli aspetti più significativi di come il loro Paese sta realizzando uno o più *Sustainable Development Goals*.

Infine, grazie ad un accordo tra RemTech Europe e la SETAC, *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, saranno selezionati degli abstract per la loro possibile pubblicazione (come articoli completi) sulla rivista internazionale *peer review Integrated Environmental Assessment and Management*, in un numero speciale dedicato a RemTech Europe 2025.

I numeri dedicati a REMTECH EUROPE 2021 e 2022 sono già online!

- <https://doi.org/10.1002/ieam.4760>
- <https://doi.org/10.1002/ieam.4991>



# Eventi

1/2025

## 4<sup>th</sup> Workshop SETAC ILB

Napoli, 13-14 ottobre 2025

Università di Napoli Federico II

Complesso dei SS. Marcellino e Festo, Largo S. Marcellino 10



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI NAPOLI FEDERICO II



Convento dei SS. Marcellino e Festo a Napoli, sede Universitaria dove si svolgerà il Workshop.

### Contatti:

setac.ilb.2025@unisi.it

### Maggiori info:

<https://italianbranch.setac.org/events>



@SETAC.ILB



setac-italian-language-branch

### Primo annuncio

Il prossimo Workshop della *branch* italiana della SETAC si svolgerà a Napoli il 13 e 14 Ottobre 2025 nella splendido Complesso di SS. Marcellino e Festo, una delle sedi congressuali dell'Università di Napoli Federico II.

Come anche le edizioni precedenti, l'evento sarà gratuito.

#### Deadlines:

- Scadenza invio *Abstract*: 1 Giugno 2025

- Scadenza registrazione: 1 Settembre 2025.

Gli *abstract* devono essere inviati utilizzando il *template* disponibile nel sito <https://italianbranch.setac.org/events>

Temi del workshop:

- Biodiversità del Mediterraneo;
- Clima, ambiente e salute umana;
- Contaminanti emergenti e riemergenti in ambiente;
- Sostenibilità, analisi del ciclo di vita, modellistica.

#### Presentazioni orali e Poster

Le presentazioni orali potranno essere in lingua italiana e/o in inglese. Sarà particolarmente apprezzato un contenuto che integri le attività di ricerca dell'istituzione/ente di appartenenza sui temi del workshop sopra elencati.

#### Premio per il miglior studente SETAC ILB

Anche quest'anno c'è la possibilità per dottorandi di partecipare al concorso per l'iscrizione gratuita al 36<sup>th</sup> Annual Meeting 2026 della SETAC Europe. Il secondo e terzo classificato riceveranno un certificato di riconoscimento.

I candidati dovranno inviare un *abstract* esteso in lingua inglese (max 2 pagine) utilizzando il *template* dedicato al premio (disponibile nel sito <https://italianbranch.setac.org/events>). Gli studenti presenteranno la loro ricerca durante il workshop con un breve *pitch*.

**Attenzione:** La partecipazione al premio esclude la presentazione di altri contributi scientifici sotto forma di poster o presentazione orale.





Tutti i contenuti della Rivista sono liberamente accessibili, nei termini della licenza **Creative Commons** Attribuzione - Non commerciale - Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale (CC BY-NC-SA 4.0)  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>



## Consiglio Nazionale delle Ricerche Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News

**Pubblicazione quadrimestrale telematica dell'Istituto di Ricerca sulle Acque  
del Consiglio Nazionale delle Ricerche**

ISSN 2465-017X

Autorizzazione Tribunale di Tivoli n°5/2015

### **Direzione e Redazione**

Istituto di Ricerca sulle Acque, Area della Ricerca RM1, Montelibretti, S.P. 35d, km 0,700

✉ C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

e-mail: [redazione.notiziario@irsa.cnr.it](mailto:redazione.notiziario@irsa.cnr.it)

### **Direttore responsabile**

Giuseppe Mascolo

### **Direttore Scientifico**

Paola Grenni

### **Comitato di Redazione**

L. Campanella, M. Ciampittiello, C. Cruz Viggi, A.M. De Girolamo, P. Grenni, L. Guzzella,  
B. Matturo, D. Mosca Angelucci, I. Parlapiano, L. Patrolecco, S. Polesello, S. Valsecchi.

### **Segreteria di Redazione**

S. Ghergo

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