

UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE  
Sede di Piacenza

**Scuola di Dottorato per il Sistema Agro-alimentare**

**Ciclo XXVII**

**S.S.D: CHIM/01, AGR/13**

**APPLICAZIONE DI INDICATORI FISICI, CHIMICI E  
BIOLOGICI PER VALUTARE LA QUALITA' E LO STATO DI  
SALUTE DEI SUOLI**

Il caso della Regione Lombardia

**Tesi di Dottorato di: Laura Guidotti  
Matricola: 4011195**

Anno Accademico 2013/2014



UNIVERSITÀ  
CATTOLICA  
del Sacro Cuore

**Scuola di Dottorato per il Sistema Agro-alimentare**

**ciclo XXVII**

**S.S.D: CHIM/01,AGR/13**

**APPLICAZIONE DI INDICATORI FISICI, CHIMICI E BIOLOGICI PER  
VALUTARE LA QUALITA' E LO STATO DI SALUTE DEI SUOLI  
Il caso della Regione Lombardia**

**Coordinatore: Ch.mo Prof. Antonio Albanese**

---

**Tesi di Dottorato di: Laura Guidotti  
Matricola: 4011195**

**Tutor: Prof. Gian Maria Beone**

**Anno Accademico 2013/2014**

## Indice

<b>INTRODUZIONE GENERALE</b> .....	5
I. Qualità e salute del suolo.....	7
II. Il monitoraggio integrato con l'applicazione di bioindicatori.....	14
III. Il biomonitoraggio in due delle sette aree di maggior interesse dal punto di vista ambientale.....	15
✓Indicatori di genotossicità.....	16
✓Struttura delle comunità dei protozoi ciliate .....	17
✓I lombrichi .....	19
✓Caratterizzazione delle attività enzimatiche e delle comunità microbiche del suolo .....	20
IV. La valutazione dei risultati ottenuti mediante lo sviluppo di grafici radar .....	23
V. Applicazione di un biosensore luminescente per la valutazione della tossicità da diossina e composti diossino-simili	24
<b>CAPITOLO 1 : IL MONITORAGGIO CHIMICO-FISICO DELLA REGIONE LOMBARDIA</b> .....	28
1.1 Il disegno di monitoraggio.....	28
1.2 La preparazione dei campioni e le analisi effettuate .....	29
1.3 Risultati	30
1.4 La determinazione della concentrazione di <sup>60</sup> Co, <sup>134</sup> Cs, <sup>137</sup> Cs e <sup>40</sup> K nei suoli agricoli Lombardi .....	35
<sup>60</sup> Co, <sup>134</sup> Cs, <sup>137</sup> Cs and <sup>40</sup> K in agricultural soils of the Lombardia region, northern Italy .....	38
1.5 Conclusioni .....	48
<b>CAPITOLO 2: CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA E BIOLOGICA DI UN SITO DI INTERESSE NAZIONALE IN REGIONE LOMBARDIA</b> .....	50
2.1. La caratterizzazione chimico-fisica della zona di interesse .....	50
2.2 La speciazione e la disponibilità degli elementi .....	55
✓2.2.1 Analisi della concentrazione di arsenico e sua speciazione attraverso l'uso dei dispositivi DGT (Diffusive Gradient in Thin Films) .....	55
2.3 Caratterizzazione biologica del sito SIN.....	59
2.4 Le tecniche bioanalitiche – applicazione di sensori bioluminescenti per valutare la biodisponibilità di arsenico e mercurio in un sito di interesse nazionale.....	67
<i>Application of luminescent bacterial biosensors for the determination of mercury and arsenic bioavailability in a contaminated area of Northern Italy</i> .....	69
2.5 Conclusioni .....	79
<b>CAPITOLO 3: APPLICAZIONE DELLA DILUIZIONE ISOTOPICA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA PER LA QUANTIFICAZIONE DEL CROMO ESAVALENTE IN CAMPIONI DI SUOLO DI UN'AREA UBICATA NEL NORD ITALIA</b> .....	81
3.1 Caratterizzazione chimico-fisica dell'area.....	81
3.2 Il cromo esavalente .....	85

<b>Study of Cr(VI) reduction during alkaline extraction of soil samples from a contaminated area of Lombardia (Northern Italy) by using enriched stable isotopes and Isotope Dilution Mass Spectrometry .....</b>	<b>89</b>
3.3 Caratterizzazione biologica dell'area.....	97
3.4 Conclusioni.....	105
<b>CONCLUSIONI GENERALI .....</b>	<b>107</b>



## INTRODUZIONE GENERALE

Per proteggere, salvaguardare e conservare il suolo occorre prima conoscerlo.

In letteratura è possibile trovare svariate definizioni di “suolo”, di “qualità del suolo” e di “salute del suolo”. Spesso, e soprattutto negli anni passati, il tema centrale delle definizioni era la produttività agricola, la capacità del suolo di sostenere la vita umana e la sua salute attraverso la produzione di materie prime. Ovviamente questi aspetti sono fondamentali e costituiscono degli obiettivi da mantenere presenti per il futuro; ma non si può prescindere dall’ottenere e preservare la salute e la qualità del suolo di per sé.

Il suolo è “lo strato superiore della crosta terrestre, costituito da componenti minerali, organiche, acqua, aria ed organismi viventi. Rappresenta l’interfaccia tra terra, aria e acqua e ospita gran parte della biosfera” [1]. Il suolo si può suddividere in orizzonti, ognuno dei quali è dotato di specifiche proprietà chimiche, fisiche e biologiche. Il ruolo e le funzioni ecologiche che il suolo svolge sono un tema estremamente ampio, ma volendo riassumere si può dire che esso è implicato nel ciclo biogeochimico degli elementi nutritivi, nel mantenimento della biodiversità, nel controllo della quantità di anidride carbonica in atmosfera, nella regolazione dei flussi idrici sotterranei (e nel conservazione della loro qualità) e superficiali, con conseguenze dirette sui fenomeni di erosione, frane ed alluvioni.

Altra funzione fondamentale svolta dal suolo è quella di mitigare gli effetti degli inquinanti. Si considera inquinante un composto o sostanza che alteri la composizione geochimica media di un suolo e che causi effetti nocivi [2]. L’ingresso nel suolo di sostanze inquinanti va a minare l’azione mitigatrice che esso ha nei confronti del sistema idrico, ma anche nei confronti dell’atmosfera e della catena alimentare. La contaminazione diffusa può essere legata alle deposizioni atmosferiche o alle pratiche agricole, oppure a situazioni presenti sul territorio da lungo tempo, tali da non rendere più individuabile la sorgente.

La presenza di inquinanti nel terreno e le lavorazioni del suolo possono provocare la migrazione o la morte di alcuni organismi, ragione per cui essi vengono scelti come indicatori biologici ad integrazione dei dati chimico-fisici. Perciò per valutare il suo stato qualitativo e di salute, oltre a rilevare la presenza di sostanze inquinanti nel suolo, occorre considerare per esempio anche la biodiversità, specie nei terreni soggetti alle pratiche agricole. Gli organismi del suolo partecipano attivamente a svariati processi quali la sua formazione, la decomposizione della sostanza organica, il trattenimento dell’acqua e degli elementi nutritivi, la fissazione dell’azoto e il sequestro del carbonio, la soppressione o l’induzione di malattie e parassiti delle piante. Per queste ragioni essi vengono impiegati nella bonifica di suoli contaminati.

A differenza di quanto si pensava in passato, il suolo è di fatto una risorsa non rinnovabile; per tale motivo tutte le azioni che su di esso si compiono possono avere conseguenze irreversibili. Le cause di perdita del suolo possono derivare da scorrette pratiche agricole, accumulo di rifiuti mal gestito, estrema concentrazione di infrastrutture, attività industriali ed elevata densità di popolazione. La difficoltà nel determinare la qualità o lo stato di salute di un suolo, deriva dal fatto che quasi sempre se ne hanno evidenze nel momento in cui le condizioni hanno già raggiunto il punto di non ritorno. Fondamentale diventa quindi la scelta di buoni indicatori in grado di fornire informazioni utili sul divenire del sistema suolo, che permettano di ottenere indicazioni che consentano la coniugazione di fattori socio-economici ed ambientali. L’obiettivo è quello di arrivare a gestire le risorse naturali in un’ottica di salute non solo umana (fondamentale), ma anche del sistema ambientale. Tema assolutamente attuale è infatti lo *sviluppo sostenibile*, secondo

il quale quanto otteniamo oggi per il sostentamento della vita umana non deve pregiudicare la capacità di mantenimento delle generazioni future, definizione che implica la sussistenza di condizioni ottimali del contesto ambientale.

**Lo scopo del progetto** era quello di operare uno screening della salute e della qualità dei suoli agricoli della Regione Lombardia, tramite un *approccio multidisciplinare CHIMICO, FISICO E BIOLOGICO*, attraverso il quale ottenere il cosiddetto “*punto zero*”, ovvero la fotografia delle condizioni attuali dei vari parametri individuati. I dati analitici ricavati potranno essere organizzati all’interno di banche dati per operare confronti con informazioni eventualmente già presenti e con quelle che saranno raccolte in futuro, per individuare le possibili situazioni d’inquinamento diffuso o puntuale presenti, dovute alla presenza di sorgenti che emettono sostanze inquinanti. Per questo motivo abbiamo in seguito concentrato l’attenzione su sette aree di particolare interesse ambientale esposte all’emissione d’inquinanti nel terreno – e quindi potenzialmente soggette all’accumulo – a causa della presenza di attività antropiche particolarmente degne di ricevere un adeguato controllo, insieme a zone “vittime” di conclamati casi d’inquinamento del suolo e delle acque sotterranee. Fra queste vi è uno dei 57 Siti di Interesse Nazionale (SIN).

**Il progetto è stato suddiviso in due fasi:** la prima generale nella quale sono stati raccolti e analizzati 156 campioni di terreno, prendendo in considerazione il solo strato superficiale compreso tra 0 e 30 cm, intendendo indagare le suddette proprietà di quella parte del suolo interessata dalle lavorazioni agricole e quindi maggiormente “antropizzata”.

Nel secondo anno è iniziata una nuova fase d’indagine dedicata a sette aree di criticità comprovata o perlomeno sospetta. In entrambi i casi i punti campionati erano georeferenziati ma disposti secondo schemi differenti. La strategia di campionamento era invece uguale per entrambe le fasi. I terreni giunti in laboratorio sono stati preparati e sottoposti ad una serie di analisi per la caratterizzazione chimico-fisica e la quantificazione di alcuni radionuclidi gamma emittenti.

Nella prima fase del progetto, durante la quantificazione degli elementi potenzialmente tossici mediante l’utilizzo delle tecniche al plasma di spettrometria di massa e di emissione ottica (ICP-OES), abbiamo ottenuto una concentrazione che può essere definita come “pseudototale”, ovvero che rappresenta quasi tutto quello che c’è nel terreno, o meglio ciò che un attacco con una miscela di acidi forti, come l’acqua regia, può estrarre da un campione; ma, come noto, vi sono importanti parametri e proprietà che entrano in gioco nel regolare la disponibilità dei diversi elementi: reazione (pH), capacità di scambio cationico (CSC), tessitura, ecc. In generale non è detto quindi che se un elemento è presente in concentrazioni elevate sia anche tutto disponibile. Per disponibile s’intende un elemento o sostanza che acquista mobilità e la possibilità di raggiungere il comparto acquoso nonché gli spazi adiacenti agli apparati radicali. È questa la frazione potenzialmente più pericolosa, ma esiste comunque, indipendentemente da essa, un’altra quantità che è quella che effettivamente gli organismi viventi assumono e metabolizzano, che nel caso delle piante può essere moderata da sistemi di protezione situati a livello radicale. Questa informazione è molto importante perché permette di gestire al meglio situazioni che a prima vista farebbero pensare alla necessità di drastici interventi, comportanti gravi spese e la necessità d’interrompere l’attività esistente.

Questa seconda parte del progetto di monitoraggio ha visto l’applicazione di bioaccumulatori e bioindicatori (approfonditi nei successivi paragrafi). Si tratta di organismi che permettono di approfondire la conoscenza dello stato di salute dei suoli lombardi e della loro qualità. Questi, infatti, non si limitano a restituirci singole informazioni sulla presenza o assenza di determinate sostanze, ma ci offrono anche una risposta sintetica che dipende dall’interazione fra quei diversi fattori che ne regolano la disponibilità.

Oltre a conoscere il destino della singola sostanza trovata è utile conoscere e determinare quali siano gli effetti risultanti dalla simultanea presenza d’inquinanti diversi, e la distinzione tra l’origine naturale ed antropica degli elementi e delle sostanze individuate e quantificate. Tutto ciò ha un’importanza enorme, perché permette di capire in che direzione ci si

sta muovendo, sia a livello di produzione agricola ed industriale, sia rispetto alla salute umana ed all'impatto ambientale. Grazie a questo progetto sarà infatti possibile ottimizzare la risorsa suolo, individuando la vera vocazione dei singoli siti, aumentando la loro produttività, apportando correzioni laddove richiesto, e cambiando la destinazione d'uso in caso di pericolo per la salute. Questo non sarebbe possibile senza la messa in atto di un'operazione di monitoraggio. Al termine delle diverse analisi previste i dati ottenuti sono stati confrontati con i valori previsti dalla normativa nazionale, il Testo Unico Ambientale (Decreto legislativo n° 152 del 2006) che nella parte relativa alle bonifiche identifica le concentrazioni soglia di contaminazione il cui superamento impone l'avvio di verifiche sull'eventuale rischio per la salute umana.

Lo sviluppo del progetto ha coinvolto esperti delle aree scientifiche investigate appartenenti ad Università e Centri di Ricerca di livello nazionale e internazionale.

## **I. Qualità e salute del suolo**

La definizione di qualità del suolo è cambiata nel corso degli anni. La sua evoluzione è giunta a prendere in considerazione anche aspetti legati all'ecosistema e all'ambiente in generale, mentre in principio l'interesse era incentrato unicamente sulla produttività agricola [3]. Le radici di una visione più olistica di qualità del suolo affondano negli anni '70, anche se a quel tempo vi era ancora la forte convinzione che il suolo, in seguito al degrado derivante da impatto antropico possedesse la capacità di auto-riportarsi ad una condizione ottimale.

Nell'Atalante dei suoli d'Europa [4] hanno definito la qualità del suolo come la sua capacità di funzionare all'interno di un ecosistema e di interagire positivamente con quelli circostanti. Essi suggerirono una formula per determinare la qualità del suolo utile anche per valutare la risposta dei suoli alle differenti pratiche di gestione.

La Soil Science Society of America nel 1997 ha definito la qualità come la capacità del suolo di funzionare all'interno dell'ecosistema per mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale e per promuovere la salute delle piante e degli animali.

Nel 1999 in Germania viene creato il "Federal Soil Protection Act". Lo scopo era quello di valutare se alcune caratteristiche microbiologiche del suolo fossero utili ad indicare e valutare alterazioni causate dall'uomo nella sua qualità. La qualità del suolo inizia ad essere intesa come il valore integrale delle strutture che compongono il suolo e delle sue funzioni, in relazione al suo utilizzo ed alle condizioni ambientali del sito. Essa ha impatto sulla sua produttività, sicurezza e sulla qualità del cibo, sulla salute dell'uomo e degli animali e sulla qualità dell'ambiente che ci circonda [5]. La qualità del suolo è determinata dalla combinazione delle proprietà chimiche, fisiche e biologiche che contribuiscono al suo funzionamento [6]. Inizia quindi a farsi strada l'idea che la qualità sia sensibilmente legata in maniera dinamica alle caratteristiche del suolo e che essa rifletta le condizioni derivanti dalla sua gestione, verso le quali il suolo sviluppa resistenza (o meno) agli stress imposti dalle forze naturali o dagli usi umani. Due dei più importanti fattori associati al concetto di qualità del suolo sono perciò le sue proprietà ed i processi dinamici che in esso avvengono. Per questo la determinazione della qualità deve tenere in considerazione le proprietà fisiche, chimiche e biologiche, i processi e le loro interazioni [7].

La qualità del suolo, per essere meglio determinata, andrebbe poi riferita al tipo di ecosistema che si sta considerando [8]. Nel caso del nostro progetto si parla di suoli principalmente dedicati all'attività agricola, e quindi non di suoli naturali.

Il concetto di salute del suolo è stato considerato più o meno sinonimo di qualità, e definito soprattutto in termini chimico-fisici, mentre ancora una volta è fondamentale anche la componente biologica. Una distinzione fra qualità del suolo e salute può essere quella che vede la qualità come l'attitudine a svolgere una determinata funzione, e la salute invece quella che fa riferimento alla condizione generale del sistema suolo [9].

La salute del suolo è determinata innanzitutto da caratteristiche ecologiche; essa può essere considerata come sottoinsieme della salute dell'ecosistema, associata alla diversità e alla stabilità biologica. Un ecosistema in salute è caratterizzato da flussi energetici e di elementi nutritivi, stabilità e resilienza in caso di stress e disturbi. Ne deriva che la capacità di soppressione di disturbi e malattie che si attua in determinati casi può essere utilizzata come un buon indicatore di salute di un ecosistema. Un suolo quindi può essere considerato in salute quando è stabile, possiede resilienza nei confronti dello stress, ha elevata diversità biologica e flussi di elementi nutritivi.

Valutare la resilienza di un suolo non è però semplice. Essa è stata definita come la capacità insita in esso di tamponare gli effetti negativi, tollerare gli stress e di rigenerarsi. Per avere un'idea di ciò si può valutare la biodiversità presente nel sito, facendo riferimento a diversi attributi quali per esempio la struttura e la diversità funzionale della popolazione microbica. In questi termini, maggiore è la diversificazione funzionale, più veloce sarà il ripristino delle condizioni esistenti prima dell'azione di disturbo. I fattori di stress che possono interessare un suolo sono di tipo chimico, fisico e biologico. Chimicamente parlando i disturbi possono dipendere da valori di pH, presenza di sostanze inquinanti, carenza di elementi nutritivi; da un punto di vista fisico la temperatura e la matrice stessa possono avere effetti negativi, mentre per stress biologico si può intendere la presenza di organismi patogeni o predatori. Se consideriamo la biodiversità un indicatore della salute del suolo vedremo che ogni evento di disturbo darà il via ad una successione nella comunità batterica associata alla catena alimentare, contemporaneamente prima ad una perdita di biodiversità e successivamente ad un aumento della stessa. La velocità con cui la comunità biologica torna alle condizioni di partenza riflette la durata dell'evento di disturbo. In seguito all'aggiunta imponente di elementi nutritivi, per esempio, ci si aspetta che la diversità nella comunità microbica declini selezionando solo quelle specie in grado di rispondere velocemente a un eccesso di elementi nutritivi. La biodiversità massima la si ha invece in quegli ecosistemi cosiddetti climax [10].

Da quanto appena visto appare logico considerare una definizione di qualità di suolo più olistica: essa è quindi la capacità di sostenere i servizi ecosistemici, le proprie funzioni e processi ecologici, in maniera paragonabile a quella che verrebbe messa in atto da un suolo preso a riferimento [9]. Si tratterebbe quindi di trovare un suolo ideale in cui nessuna contaminazione ed elemento di disturbo siano rilevabili. La soluzione migliore però, anche alla luce delle diversità che all'interno dell'intero territorio regionale si manifestano, è quella di studiare il divenire del sistema suolo di ogni sito preso in considerazione, allo scopo di rilevare gli eventuali impatti derivanti dalla sua gestione o dalla presenza di sostanze inquinanti.

La comprensione dei processi del suolo è la chiave per stimare le influenze delle pratiche agricole sulla fertilità, sullo stato qualitativo e, conseguentemente, sull'ambiente [11]. Il suolo fornisce servizi e beni ecosistemici valutabili, quali la riserva di carbonio e acqua, risorse che vanno mantenute allo scopo di assicurare un ambiente ed una società sostenibili. Definire il livello di qualità del suolo quindi diventa un obiettivo imprescindibile. Gli organismi viventi del suolo sono degli ottimi indicatori circa i cambiamenti in atto; essi infatti sono in grado di reagire velocemente a stress sia di origine naturale che antropica, oltre a fornire risposte che derivano da più impatti contemporaneamente. La biodiversità del suolo è stata riconosciuta dalla Convention on Biological Diversity (2002) e dalla Commissione Europea nel 2006 come elemento fondamentale per il corretto funzionamento dell'ecosistema e la produzione di servizi per l'umanità [12].

Come già accennato, il suolo non è una risorsa inesauribile, e se usata in maniera inadeguata può essere persa anche in tempi brevi, con poche possibilità di recupero. Spesso i segnali che il suolo sta subendo un processo di degrado, arrivano quando è ormai troppo tardi. Un elemento ulteriormente complicante è dato dal fatto che il suolo non cambia necessariamente al cambiare delle condizioni esterne o in seguito all'uso che se ne fa; spesso esso agisce da buffer, tamponando gli effetti negativi e filtrando le sostanze potenzialmente pericolose perlomeno fino ad un certo limite. Questa proprietà diventa rilevante in alcuni casi, come per esempio durante lo spandimento di fanghi contenenti alte concentrazioni di metalli pesanti [6, 15]. Tale capacità però è limitata, e se si eccede nell'aggiungere la quantità di fango, ne consegue una perdita di qualità. A volte, per la natura stessa del suolo, matrice estremamente complessa, diventa difficile capire se l'origine di alcuni cambiamenti sia da riferire alle attività dell'uomo od alla natura.

Nel 1994 Pierzynski et al. [13], hanno suggerito tre motivazioni alla perdita di qualità del suolo: eccessiva presenza di contaminanti; limitazione delle funzioni del suolo; messa in circolo di contaminanti provenienti dal terreno stesso [14].

L'insieme di sintomi di disagio non specifici viene definito comunemente "stress". In questa condizione un sistema subisce una forza alla quale procura una risposta, che precede il danno vero e proprio, al quale non è più in grado di compensare. Per prevenire una situazione irreversibile occorre cercare le risposte che le varie componenti ecosistemiche forniscono in condizioni di stress. Le risposte in questione passano attraverso diversi stadi. Fränze nel 2006 [15] illustrava l'esempio delle piante che evidenziano inizialmente una condizione di allarme nella quale inizia a venir meno lo svolgimento di alcune funzioni, fino al declino sempre più spinto della propria vitalità. Nell'articolo si suggerisce di mettere al primo posto il riconoscimento di situazioni di stress in atto. Questo è quanto è stato fatto nella seconda fase del nostro progetto. La precoce previsione di tendenze nel sistema ambientale in generale diventa sempre più una necessità, e per questo è fondamentale possedere un insieme di indicatori che si orientino alla scoperta di sintomi da stress, reagendo velocemente ai cambiamenti ambientali. Qui vengono definiti degli "*environmental fever thermometers*" [15].

Un disegno per determinare la qualità del suolo deve identificare le funzioni critiche, e selezionare indici che diano risposte utili su come un suolo stia funzionando [7].

L'uso di funzioni ecologiche del suolo quali indicatori di stress chimici implica la determinazione dei valori di background naturale per i diversi elementi chimici d'interesse. Nello stesso articolo di Fränze [15] già citato si raccomanda l'individuazione di tre diversi valori limite della qualità del suolo:

- suolo privo di stress; è caratterizzato da multifunzionalità, ottima conservazione delle specie;
- basso livello di effetti avversi sulle funzioni ecologiche del suolo, risultanti in perdita di organismi;
- disturbi sul lungo tempo o permanenti delle funzioni ecologiche essenziali, insieme ad un alto grado di perdita di specie, pericolosi flussi di sostanze chimiche, riduzione delle possibilità di uso dei suoli [15].

Come descritto anche nell'articolo di Arshad e. Martin [16] il monitoraggio che comprende indicatori della qualità del suolo necessita una buona strategia di campionamento, che deve andare incontro all'eterogeneità del suolo, alle fluttuazioni stagionali e far fronte alle incertezze analitiche.

La strategia di monitoraggio è costituita da una serie di processi che producono un set di dati corrispondenti agli obiettivi dello studio in questione e alle caratteristiche del contesto preso in esame. Include il disegno di campionamento, le procedure analitiche, la conservazione dei campioni e la gestione dei dati in vista delle analisi statistiche. Un fattore molto importante che occorre tenere in considerazione è la scala alla quale si vuole compiere una valutazione della

qualità del suolo. La natura, provenienza e il numero di campioni coinvolti sono informazioni necessarie nello strutturare una valutazione di qualità [14].

In un lavoro svolto da Gil-Sotres nel 2005 [9] ci si chiede quali parametri del suolo riflettano meglio i suoi cambiamenti, cercando inoltre di capire con quale suolo fare una comparazione, quali proprietà biochimiche prendere in considerazione e valutare per ottenere delle risposte.

Come già accennato, il suolo che costituisce il termine di paragone dovrebbe essere quello che possiede il massimo valore di qualità. Tuttavia non è ancora ben chiaro come e quando la qualità possa essere considerata massima. L'idea potrebbe essere quella di considerare un suolo che abbia raggiunto un equilibrio all'interno di tutte le sue componenti ambientali, ovvero che abbia raggiunto il climax; oppure, la qualità massima potrebbe essere intesa come la capacità di un suolo di mantenere alta la produzione con il minimo impatto ambientale. L'impatto che un suolo subisce può essere rilevato osservando gli effetti che la gestione produce nel tempo. Questo coincide abbastanza con la nostra idea di "termine di paragone". Il miglior campione di riferimento, parlando di suolo, è quello che più assomiglia a ciò che stiamo studiando, ma la variabilità insita nella natura del suolo rende davvero difficoltosa la ricerca di un "bianco" che vada bene per terreni provenienti da aree ampie come la Regione Lombardia. Per questo motivo la scelta migliore sembra essere quella per cui ogni campione è il termine di riferimento per sé stesso nel divenire degli anni. Anche un suolo che ha raggiunto la condizione di climax, infatti, subisce, per esempio, delle variazioni climatiche stagionali, che sono strettamente collegate alla sua posizione geografica.

Un altro passaggio fondamentale di un monitoraggio è la raccolta d'informazioni riguardante le condizioni del suolo, l'uso, il sistema di coltivazione, gli input forniti al sistema e gli output, comprese le informazioni che si possono richiedere direttamente all'agricoltore [5]. Tutto ciò è stato da noi raccolto all'interno di un'apposita scheda di campionamento, fornita anche di foto scattate al momento della raccolta del campione.

Le linee guida suggerite nell'articolo appena citato per il buon svolgimento di un'opera di monitoraggio della qualità del suolo includono [5]:

- la suddivisione dell'area di studio in differenti zone ecologiche;
- la selezione delle zone ecologiche con lo stesso tipo di suolo;
- la selezione dell'obiettivo: protezione ambientale, ottimizzazione dell'uso del suolo;
- la selezione degli indicatori opportuni;
- la selezione di un valore di riferimento per ogni indicatore;
- l'individuazione dei limiti critici per ogni indicatore entro i quali esso può oscillare ed al di fuori dei quali le variazioni sono significative;
- la trasformazione degli indicatori in indici, per esempio di qualità del suolo;
- testare la procedura servendosi di diverse tipologie di suolo.

Appare anche qui confermata la necessità di definire il termine qualità attraverso la scelta di indici. Un indice di qualità del suolo può essere definito come **quell'insieme minimo di parametri che, quando incrociati, forniscono dati numerici in merito alla capacità del suolo di sostenere una o più funzioni**. Un indicatore di qualità del suolo è una proprietà misurabile che influenza la capacità di un suolo di portare avanti una data funzione [55]. Ovviamente alla base di un buon lavoro in questo campo, vi è la necessità di dare una definizione condivisa di salute e qualità del suolo e dividere gli indicatori in generali e specifici. Fanno parte degli indicatori generali la biodiversità, la stabilità e la capacità di auto-rimediazione [10].

In passato, come già menzionato, i parametri indagati si riferivano soprattutto alla capacità del suolo di sostenere la produzione agricola. Un esempio è il lavoro condotto da Mairura et al. 2007 in Kenya [3], nel quale vengono sviluppati degli indici di qualità basati anche sulla percezione di essa da parte degli agricoltori, i quali riconoscevano che la qualità varia con lo spazio e viene stabilita attraverso vari parametri tra cui il colore, la tessitura, il raccolto.

Da quanto affermato fino ad ora appare che per valutare la qualità di un suolo occorra giostrarsi fra le tante proprietà fisiche, chimiche, biologiche e biochimiche che lo caratterizzano. Il suolo e le biocenosi manifestano differenze principalmente legate agli aspetti funzionali. Le funzioni possono essere misurate stimando la capacità di un sistema. Riguardo al grado di naturalezza di un sistema si possono distinguere due tipi di funzioni: quelle naturali o ecologiche e quelle socio-economiche [15]. Visto che le proprietà fisico-chimiche di un suolo vengono alterate solo da eventi drastici, la loro stima come unica fonte per un monitoraggio non è sufficiente a percepire con largo anticipo cambiamenti che poi potrebbero rivelarsi irreversibili. I parametri biologici e biochimici, invece rispondono celermente anche a piccole pressioni ambientali [9].

Gli indicatori biologici rappresentano diversi aspetti della qualità del suolo, e vengono impiegati per quantificare o monitorare fondamentalmente tre parametri:

- lo sviluppo della struttura del suolo;
- la scorta di elementi nutritivi;
- l'attività biologica.

Di questa categoria fanno parte le proprietà microbiche del suolo, che provvedono informazioni che integrano diversi fattori ambientali; esse sono in grado di indicare cambiamenti nella qualità del suolo, derivanti dai vari tipi di gestione dello stesso. I parametri biologici del suolo vengono considerati indicatori dinamici estremamente sensibili ai cambiamenti nelle condizioni del suolo [14]. Quelli che vengono prevalentemente impiegati sono: indicatori di biomassa (Carbonio della biomassa microbica, respirazione indotta dal substrato); indicatori di attività (respirazione basale, azoto mineralizzabile, tasso di nitrificazione, attività enzimatica); indicatori di diversità (livello della comunità e profili genetici) [6,9]. Nortcliff [14] suggerisce la considerazione delle popolazioni di micro, macro e meso-microrganismi, il tasso di respirazione e altri indici di attività microbica. Altri indici derivano da alcune caratteristiche della sostanza organica del suolo fra cui: il carbonio organico, il carbonio mineralizzabile e gli enzimi del suolo.

Per avere un'idea di salute del suolo si possono prendere in considerazione specie a strategia *k* o organismi appartenenti ai più alti gruppi tassonomici, quali per esempio i lombrichi, i nematodi ed i collemboli [10].

Anche van Bruggen e Semenov [10] suggeriscono che la risposta della comunità microbica ad uno stress possa essere misurata in termini di attività e biomassa valutando la respirazione, il rapporto fra respirazione e biomassa microbica, che aumenta in ecosistemi che hanno subito una perturbazione, per poi tornare a diminuire con il raggiungimento della stabilità. Anche la soppressione delle malattie è un importante indicatore di salute del suolo.

Tuttavia, secondo Garbiasu [8] le misurazioni microbiche che si compiono, seppur precise, non sono ancora del tutto correttamente rapportabili al concetto di qualità del suolo, anche per il fatto che sono altamente dipendenti dal contesto. Si necessiterebbe perciò di indicatori che siano più universali, ovvero più slegati dal contesto ambientale. In questi termini sono stati suggeriti biodiversità, stabilità ed auto-riparazione dei danni [8].

La difficoltà della scelta degli indici risiede nella ricerca di indicatori quantificabili della qualità del suolo, e nel fatto che i cambiamenti che in esso avvengono richiedono spesso periodi di tempo lunghi, e che possono essere percepiti quando una serie di effetti si combinano [9].

La selezione dei parametri indice deve basarsi su: uso del suolo, relazione fra l'indicatore e la funzione che svolge, facilità di misura e utilità, conoscenza ed importanza della sua variabilità spazio-temporale, sensibilità ai cambiamenti di gestione del suolo, comparabilità con i campionamenti e monitoraggi routinari, conoscenza delle modalità d'interpretazione e comparazione dei dati ottenuti [14]. Gli indicatori della qualità del suolo devono rispondere alle pratiche di gestione ed ai cambiamenti in generale; devono essere quantificabili permettendo così una valutazione protratta nel tempo, ed una comprensione delle cause dell'eventuale degrado: antropiche o naturali. Occorre quindi un appropriato punto di partenza utile all'interpretazione ed alla previsione [6].

Esistono **alcuni requisiti** che un buon indicatore deve possedere: la sensibilità al maggior numero possibile di agenti di degrado che possano agire su un suolo; la proporzionalità al cambiamento che un determinato contaminante stia ponendo in atto; la capacità di riflettere diversi gradi di degrado. L'importanza nell'aver ben chiaro quali caratteristiche un indicatore debba possedere e quali risposte debba fornire risiede nel fatto che diversamente da quanto appena affermato, la valutazione non avrebbe nessuna utilità [9].

Ci sono diversi livelli attraverso i quali sviluppare un monitoraggio che consideri anche parametri biologici; il primo è quello della comunità biotica, ovvero che considera le proprietà relative alla struttura della popolazione microbica, fra cui la composizione e la distribuzione dei diversi gruppi funzionali. Il secondo livello è quello della popolazione, che considera le dinamiche di organismi o di comunità di organismi. Il terzo livello è quello ecosistemico, che considera proprietà implicate nei cicli di elementi quali azoto (N), fosforo (P), zolfo (S) e carbonio organico (C), e che sono correlate alla dimensione, attività e densità della biomassa microbica, oltre che all'attività degli enzimi del suolo. La maggior parte delle proprietà biochimiche del suolo usate quali indicatori di qualità riflette l'attività dei processi microbici, o quella degli enzimi idrolitici del suolo, entrambe in grado di riflettere i flussi di sostanza organica e degli elementi essenziali nel suolo. Quindi, in generale, i parametri biologici che si usano in un progetto di monitoraggio, devono caratterizzare il suolo come una parte dinamica della biosfera, e possono essere usati come proprietà individuali, inserite in indici semplici o in indici complessi.

Le proprietà individuali che possono essere usate come indicatori sono:

- **il carbonio della biomassa microbica.** Rappresenta la componente vivente della sostanza organica del suolo. Essa prende parte alle trasformazioni di C, S, N e P, alla degradazione degli xenobiotici e all'immobilizzazione dei metalli pesanti, oltre che partecipare alla creazione della struttura del suolo. I risultati che si sono ottenuti con questo parametro nel corso del tempo sono contraddittori: esso può aumentare nel caso di terreni adibiti a pascolo, ma anche attuando rotazioni fra coltivazioni cerealicole e pascolo, e per l'aggiunta di fertilizzanti organici, oltre che decrescere in suoli coltivati. Non dà risposte coerenti in caso di aggiunta di erbicidi. Inoltre questo parametro non è un buon indicatore della tossicità dei metalli pesanti nei suoli.

- **Attività delle deidrogenasi.** È indice del sistema redox microbico e delle attività ossidative del suolo. Anche in questo caso si sono ottenute delle informazioni contraddittorie. Per esempio l'aratura può accrescere o diminuire tale attività, mentre l'aggiunta di fertilizzanti organici, effluenti di allevamento e rifiuti industriali generalmente l'aumentano. Per quanto riguarda i metalli pesanti, l'attività non viene influenzata se non da dosi veramente massicce. Questo parametro viene anche usato per valutare il grado di recupero di un suolo in seguito a contaminazione dovuta all'estrazione di petrolio, o di composti idrocarburi più in generale.

- **Capacità di mineralizzazione dell'azoto.** La mineralizzazione dell'azoto è il rilascio di azoto inorganico dalla sostanza organica del suolo. Questo processo viene regolato da alcune proprietà del suolo, come la qualità della sostanza organica, la biomassa microbica e la sua attività e la temperatura ed umidità del suolo. Tale indice risponde bene al



livello di disturbo del sito, così come anche la presenza di specifici organismi e le loro comunità intese in termini di gruppi funzionali e biodiversità [6]. Anche se le variazioni stagionali influenzano molto questo parametro, esso cresce nel caso di pascolo, ma anche di aratura, forse perché in questo caso viene anche aggiunta sostanza organica al suolo.

- **Idrolasi.** È in grado di rispondere alle diverse gestioni del suolo ma anche alla presenza di contaminanti. Può essere alta finché vi è un alto tenore di sostanza organica, e a causa di aggiunta di fertilizzanti organici, mentre si abbassa in seguito all'uso di fertilizzanti a base di fosfati (di cui le esterasi).

- **Fosfomonoesterasi.** Decresce in maniera significativa con la presenza di piombo ed altri metalli pesanti, e temporaneamente per la presenza di agrofarmaci.

-  **$\beta$ -glucosidasi.** È bassa in suoli arabili, ma può crescere in seguito alla fertilizzazione organica, quindi non sembra essere un indicatore potente.

- **Ureasi.** Anche per l'ureasi si applicano i concetti espressi per la  $\beta$ -glucosidasi.

Il fatto di usare delle singole proprietà come indicatori, non è sufficiente all'ottenimento della stima di qualità del suolo. Un buon indicatore deve infatti misurare una o più funzioni del suolo, essere sufficientemente sensibile ai cambiamenti dovuti ad un fattore di disturbo, gestione o recupero, essere facilmente interpretabile, e facilmente ottenibile oltre che poco costoso.

La singola proprietà biochimica poi, non è in grado di distinguere un effetto causato da un evento di contaminazione da uno avvenuto prima della comparsa del contaminante stesso.

Dalle proprietà individuali si passa quindi all'uso di indici semplici, derivanti per esempio dal relazionare due proprietà del suolo. Questi possono essere:

- **il quoziente metabolico  $qCO_2$ .** Esso cresce in ecosistemi che hanno subito una distorsione, rispetto a sistemi stabili. Questa crescita potrebbe essere dovuta a una caduta di efficienza di utilizzo del substrato, ma può essere anche insensibile ai disturbi e ai cambiamenti nell'ecosistema. Tuttavia esso è considerato un buon indicatore di stress dovuto alla presenza di metalli pesanti nei suoli, mostrando una crescita. È stato però visto che suoli altamente produttivi hanno  $qCO_2$  paragonabili a quello di terreni contaminati. In più il  $qCO_2$  relativo a suoli stabili non ha significato universale.

- **efflusso di  $CO_2$ :** indice di attività biologica totale del suolo. È indice della disponibilità del carbonio. Diminuzioni che superano il 30% indicano presenza di danni [6].

- **il rapporto fra proprietà biochimiche e il contenuto totale di carbonio ed azoto del suolo.**

- **rapporto tra attività enzimatica del suolo e biomassa microbica.**

Anche questi indici sembrano possedere contraddizioni e limitazioni [9].

Esistono infine gli indici complessi, ottenuti combinando diverse proprietà del suolo applicando analisi statistiche quali la PCA (Analisi delle Componenti Principali). Si possono quindi ottenere informazioni considerando il contenuto in biomassa microbica, la sua attività generale (respirazione basale, attività della deidrogenasi), l'attività microbica specifica (proteasi,  $\beta$ -glucosidasi), inserendo tali dati in grafici a radar e ottenendo informazioni relative sia alla diversità che alla vitalità [9].

Nell'ottica di migliorare quanto più possibile l'interpretazione dei dati che gli indicatori forniscono, si ritiene opportuno collegare il concetto di qualità del suolo con quello di funzioni dell'ecosistema. In questi termini la qualità del suolo può essere vista come un sottoinsieme della funzionalità ecosistemica. Quest'ultima caratteristica si compone di un insieme di attributi che vengono determinati. Si tratta di:

- **vigore,** produzione dell'energia che viene creata all'interno del sistema (C microbico, respirazione, produzione vegetale, attività enzimatica totale);

- **organizzazione**, diversità interna e grado di dipendenza ed interazione (biodiversità microbica);
- **stabilità**, risposta a fattori di stress (integrazione di indici di resistenza e resilienza; effetto dello stress su respirazione, mineralizzazione dell'azoto, tasso di nitrificazione);
- **capacità di sopprimere i danni** (biosaggi con piante);
- **ridondanza**, (numero di specie presenti all'interno di specifici gruppi funzionali).

Lo scopo sarebbe quindi quello di verificare lo stato di qualità di questi attributi, e a livello dei vari indicatori già noti, per poi determinare la qualità del suolo [8].

## **II. Il monitoraggio integrato con l'applicazione di bioindicatori**

Con l'evoluzione biologica gli organismi viventi hanno trovato il modo di adattarsi alle condizioni ambientali, sviluppando diverse modalità di difesa. Quando però l'ambiente raggiunge determinate condizioni che vanno oltre i limiti di adattabilità, gli organismi muoiono. Questo succede perché vengono provocati dei cambiamenti nelle loro funzioni degli organismi, oppure nelle proprietà ambientali. Il nostro scopo è trovare queste eventuali proprietà (dell'ambiente o degli organismi viventi) modificate.

Il grado di esposizione a determinate sostanze (metalli pesanti, xenobiotici e loro metaboliti) dipende dalla loro concentrazione, stabilità, tasso di migrazione e potenziale di bioaccumulo.

Gli organismi viventi, essendo parte dell'ecosistema, possono dare delle risposte in merito al livello di degrado ambientale.

Per le analisi ambientali esistono due gruppi di metodi biologici:

- le **tecniche bioanalitiche**, che prevedono per esempio l'uso di biosensori;
- i **biomonitoraggi**.

Il biomonitoraggio è una tecnica analitica che sfrutta organismi viventi per fornire informazioni in tempo reale sulle condizioni dell'ambiente considerato.

I bioindicatori usati in questo campo possono essere distinti fra quelli che manifestano chiaramente un cambiamento morfo-strutturale in risposta a cambiamenti ambientali, e quelli che non rispondono in maniera visibile, ma accumulano sostanze inquinanti, il cui quantitativo viene poi determinato.

I bioindicatori possono essere distinti anche in qualitativi e quantitativi. I bioindicatori qualitativi saranno presenti in un certo contesto in presenza di determinate condizioni, mentre nel secondo gruppo sarà importante determinare il numero di individui e rapportarlo alle condizioni ecosistemiche.

Le proprietà degli organismi viventi che vengono selezionate come indicatori ambientali, sono sfruttate in analisi qualitative e nella determinazione del grado di degrado ambientale, allo scopo di predire futuri cambiamenti indotti nella natura dall'uomo.

Un bioindicatore è in grado di manifestare una risposta precisa in determinate condizioni ambientali, ed è dotato di alcune caratteristiche imprescindibili:

- **Accessibilità e ubiquità**. Occorre poter campionare facilmente l'indicatore in questione e soprattutto è necessario che sia distribuito su tutto il territorio considerato;
- **Rappresentatività**, cioè buona correlazione con il sito cui appartiene;
- **Affidabilità**, in quanto occorre minimizzare gli errori e che esso sia facilmente quantificabile.

Un bioaccumulatore è in grado di accumulare elevate concentrazioni di sostanze normalmente nocive, senza sviluppare sofferenza.

La necessità di proseguire l'indagine andando oltre la conoscenza del dato fisico-chimico risiede nel fatto che la vera pericolosità delle sostanze nocive presenti dipende dalla possibilità che esse passino dal comparto suolo alle acque ed agli organismi viventi, cioè diventino mobili. In tal caso esse potrebbero entrare nella catena alimentare e dare origine a fenomeni di biomagnificazione.

Gli organismi vegetali vengono sempre più presi in considerazione per la loro sensibilità ai cambiamenti nella composizione chimica ambientale ed anche perché alcune specie sono in grado di accumulare gli inquinanti.

Organismi vegetali inferiori vengono per esempio impiegati nella determinazione delle deposizioni atmosferiche di metalli pesanti ed altre sostanze contaminanti [16].

Esistono dettagli nella misurazione dei cambiamenti in ciascun indicatore selezionato che sono indispensabili [16]:

- **direzione** verso cui punta il cambiamento: positivo o negativo, crescita o diminuzione;
- **magnitudo**: percentuale del cambiamento rispetto ad un valore base;
- **tasso di cambiamento – durata**;
- **estensione del cambiamento**.

In generale i bioindicatori possono essere suddivisi in tre gruppi:

- **organismi test**, usati in test tossicologici;
- **indicatori di effetti e accumulatori**, dotati di bassa resistenza e basso potenziale di adattamento i primi, mentre i secondi devono essere in grado di accumulare grandi quantità di inquinanti senza subire danneggiamento;
- **bioindicatori passivi ed attivi**, i quali vengono intenzionalmente esposti a fattori di stress, mentre i primi vengono valutati direttamente in situ.

La qualità dei dati ottenuti da un biomonitoraggio dipende dal fatto che quanto si osserva debba essere rappresentativo e rilevante.

L'importanza di alcuni vertebrati ed invertebrati negli ecosistemi terrestri li rende ottimali per la bioindicazione. Per esempio *Lumbricus rubellus* e *Lumbricus terrestris* vivono nell'orizzonte superiore e si nutrono della sostanza organica che qui trovano. La loro diversità e ampia distribuzione li rende ottimali per obiettivi di monitoraggio e per i test di tossicità, vista la loro limitata mobilità che li porta a incorporare grandi quantità di materiale proveniente da piccoli spazi.

### **III. Il biomonitoraggio in due delle sette aree di maggior interesse dal punto di vista ambientale**

Come già precedentemente illustrato, durante il nostro lavoro di monitoraggio abbiamo deciso di concentrare l'attenzione su alcune aree della regione Lombardia interessate dalla presenza di attività con un certo potenziale di impatto ambientale, oppure su siti nei quali si sono verificati in passato degli eventi di contaminazione particolarmente gravi.

Per mostrare i risultati ottenuti saranno prese ad esempio solo due delle sette aree totali, sulle quali abbiamo svolto ulteriori approfondimenti che ci hanno permesso di sperimentare l'applicazione di tecniche innovative e promettenti.

La descrizione approfondita delle due aree in esame si trova nei capitoli 2 e 3; si tratta del Sito di Interesse Nazionale e dell'area di dispersione di cromo esavalente nelle acque sotterranee. In questa parte di tesi vengono elencati ed illustrati gli indicatori utilizzati, mentre nelle conclusioni generali verranno commentati i risultati ottenuti.

### ✓ **Indicatori di genotossicità**

Tra l'ampio spettro d'inquinanti che possono essere presenti nel suolo, meritano particolare attenzione i composti ad azione genotossica. Si tratta generalmente di sostanze che, data la loro struttura, sono in grado di alterare il DNA, causando addotti, alterazioni chimiche delle basi azotate, legami crociati e rotture a livello di singolo e doppio filamento [18]. Tali sostanze sono generalmente cancerogene, capaci cioè di provocare tumori negli esseri viventi [19,20].

Stimare il potenziale genotossico di un suolo diventa quindi di rilevante importanza per valutare la qualità di un suolo, il rischio sanitario dovuto a fenomeni di esposizione diretta (tramite contatto dermico o ingestione) o indiretta (tramite il consumo di prodotti alimentari di origine vegetale o animale ottenuti nell'area contaminata) e per poter ottenere le informazioni necessarie ad effettuare una gestione efficiente del territorio. Sebbene le analisi chimiche rappresentino il metodo più diretto per valutare la presenza di un contaminante nell'ambiente, occorre sottolineare come la relativa pericolosità non dipenda solo dalla quantità, ma dalla sua interazione con altri contaminanti, dalla durata dell'esposizione agli organismi (dose) e dalla sua biodisponibilità, cioè dalla quantità di sostanza, in forma libera e biologicamente attiva, che si trova a disposizione delle strutture bersaglio. Infatti, la capacità delle tradizionali analisi di tipo chimico di definire un livello d'inquinamento deriva dalla possibilità di qualificare e quantificare i singoli composti. Tale strategia si dimostra limitata e non in grado d'evidenziare il rischio cancerogeno, poiché molte delle sostanze cancerogene non sono ancora conosciute o sono attive a livelli sotto la soglia di rilevabilità degli strumenti usati nelle analisi chimiche [15].

Per stabilire la reale entità del rischio sia per l'ambiente, sia per l'uomo risulta quindi necessario integrare i dati derivanti da indagini chimiche con quelli ricavati da analisi biologiche. In ambito biologico hanno avuto un notevole sviluppo e applicazione le tecniche di bioindicazione. In particolare le piante sono ottimi bioindicatori perché (i) trovandosi alla base della catena alimentare, subiscono gli effetti degli xenobiotici prima degli altri livelli trofici evidenziando così i possibili danni prima che l'intero ecosistema ne venga interessato; (ii) sono risultate più sensibili a determinanti gruppi d'inquinanti quali gli erbicidi [21]; (iii) hanno risposte, in termini di anomalie genetiche, comparabili a quelle degli animali [22]; (iii) sono facili da coltivare.

Per la stima della genotossicità del suolo e dell'aria, negli anni scorsi è stato sviluppato un protocollo basato sulla rilevazione, mediante tecniche molecolari, dei danni genotossici indotti dagli inquinanti del suolo nel trifoglio bianco (*Trifolium repens* L.), usato come bioindicatore [23]. Questo protocollo è stato ampiamente applicato dimostrandosi attendibile e molto utile per definire la qualità degli ambienti.

La stima del potenziale genotossico dei suoli campionati è stata effettuata seguendo il protocollo di Citterio et al. (2002) [23] che prevede l'applicazione dei marcatori molecolari, tecnica adeguata a determinare le eventuali variazioni a livello della sequenza del DNA indotte dalla presenza nel suolo di inquinanti genotossici.

## ✓ Struttura delle comunità dei protozoi ciliate

Microorganismi eucariotici come i protozoi (ciliati, flagellati ed amebe) costituiscono una essenziale, seppur ancor poco studiata, componente di tutti gli ecosistemi incluso l'ecosistema suolo (Figura 1 A) [24]. I protozoi svolgono ruoli chiave in tutte le tipologie di suolo incluse quelle influenzate dalle attività umane (aree agricole, urbane, industriali). Essi nutrendosi principalmente di batteri, contribuiscono a stimolare i processi di mineralizzazione soprattutto a livello della rizosfera determinando, in questo modo, degli effetti benefici sulla crescita delle piante. I protozoi costituiscono, infatti, un ingranaggio essenziale del cosiddetto *soil microbial loop* [25]. I protozoi ciliati per sopravvivere in un ambiente "difficile" come il suolo hanno evoluto una serie di adattamenti che includono tra gli altri, la possibilità di produrre delle "cisti" (*resting cysts*) che gli consentono di superare periodi di scarsità di cibo e/o di essiccamento (Figura 1 B). Il numero di protozoi presenti nel suolo (inteso sia come forme attive in grado di nutrirsi che come forme inattive, cioè cisti) può variare da 10.000 fino ai 100.000 ind.g<sup>-1</sup> di suolo in rapporto al contenuto di C organico, N, umidità, tessitura, livello di contaminanti e disponibilità di cibo [26]. Anche le strategie riproduttive entrano in gioco al fine di favorire la sopravvivenza nel suolo. Ad es. in alcuni taxa di ciliati del suolo come nei *Colpodea*, la presenza di una cisti quadripartita determina un tasso di crescita estremamente rapido che conferisce a questo gruppo, un elevato vantaggio competitivo nei suoli disturbati. Ai *Colpodea* appartengono, infatti, specie a selezione *r* mentre le specie a selezione *k*, caratterizzate da tassi di crescita più lenti, appartengono per lo più al gruppo degli *Spirotrichea* e degli *Heterotrichea* generalmente identificati come polimenofora [27]. Le specie a selezione *k* al contrario delle specie a selezione *r*, sono preferenzialmente presenti nei suoli stabili, non disturbati.

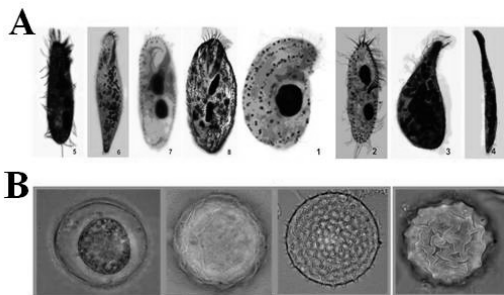


Figura 1. A: Protozoi ciliati; B: Cisti. (Foto A. La Terza)

La sensibilità dei ciliati ad un ampio spettro di inquinanti è stata ben documentata sia in specie modello (es. *Tetrahymena*) principalmente attraverso la messa a punto di saggi ecotossicologici di laboratorio [28, 29] sia *sul campo* [30, 31]. In particolare, studi volti ad analizzare la struttura delle loro comunità hanno fornito elementi preziosi per valutare e monitorare cambi nell'ambiente abiotico e biotico e a valutare gli eventuali impatti derivanti da attività agricole ed industriali [32,33].

Al fine di ottenere in ciascun sito di monitoraggio, una panoramica della struttura dei protozoi ciliati del suolo e della loro variazione spaziale in risposta ad eventuali cambiamenti dei parametri ambientali, i dati biotici quali-quantitativi (numero di specie e loro abbondanze assolute) e quelli abiotici relativi ai parametri chimico-fisici ed ai contaminanti, sono stati analizzati mediante tecniche univariate e multivariate.

- **Analisi univariate:** sono stati calcolati i principali indici di biodiversità : la diversità di Shannon-Wiener ( $H'$ ), la ricchezza di Margalef ( $d$ ), l'indice di equipartizione (*evenness*) di Pielou ( $J$ ), secondo le seguenti formule:

**Shannon-Wiener index:** 
$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

E' un indice che considera, sia il numero delle specie ( $S$ ), sia la loro frequenza (abbondanza relativa)  $p_i$  all'interno della comunità. Questo Indice può variare da 0 per comunità costituite da un'unica specie (assenza di diversità) ad un massimo che dipende dal numero di specie riscontrate e dal loro grado d'equipartizione. In generale, l'indice è compreso tra 1.5 e 3.5 e raramente supera il valore di 4.5 [17].

**Margalef's richness index:** 
$$d = \frac{S - 1}{\ln(n)}$$

E' un indice che dipende dalla numerosità dei taxa presenti nella comunità ed aumenta all'aumentare della ricchezza in taxa, dove  $S$  è il numero totale delle specie;  $n$  il numero totale degli individui.

**Pielou's evenness index:** 
$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

Il valore massimo di questo indice è pari ad 1 quando tutte le specie del campione sono equamente rappresentate dallo stesso numero di individui, quindi comunità ripartite in maniera equa, corrispondenti a valori di  $H'$  vicini alla diversità massima teorica ( $H'_{\max}$ ) per un dato numero di specie.

E' stato, inoltre, calcolato anche un indice specifico per i protozoi ciliati noto come il "C/P index" che misura il rapporto tra specie a selezione  $r$  (colpoda) e specie a selezione  $k$  (polimenofora). Il rapporto fornisce un'indicazione sulla idoneità dell'habitat suolo per i protozoi ciliati. Valori uguali o superiori ad 1 indicano habitat meno idonei (condizioni variabili) alla sopravvivenza della comunità dei ciliati (e dominanza dei colpoda) mentre valori inferiori ad 1 indicano, generalmente, ambienti maggiormente idonei (condizioni stabili). Con il termine specie intermedie si vuole indicare altre specie diverse da colpoda e polimenofora (4). Per ognuno dei 4 siti monitorati è stato calcolato un C/P index complessivo sulla base delle specie dominanti presenti in ciascun sito.

- **Analisi Multivariate:** (ANOSIM, SIMPER, PCA, CCA e GPA) sono state effettuate sulle base delle matrici di distanze Euclidee dei singoli campioni, ottenuta a partire dai dati di abbondanze preventivamente trasformate con radice quadrata [18]. L'analisi SIMPER (SIMilarity PERcentage) consente di calcolare la dissimilarità media di campioni (siti/punti) appartenenti a gruppi diversi che sono definiti *a priori* e nel contempo, di estrapolare il contributo dato da ciascun taxon/specie. Questo test pertanto è utile al fine di mettere in evidenza quei taxa/specie che sono maggiormente responsabili delle differenze evidenziate tra due o più gruppi di siti/punti. Il test ANOSIM (ANalysis Of SIMilarities) è una tecnica non-parametrica che consente di verificare se le differenze fra due o più gruppi di osservazioni multivariate sono significative o meno [19]. La PCA (Principal Component Analysis) costituisce una tecnica di ordinamento molto usata in ecologia, che consente di rappresentare un insieme di dati in un numero ridotto di dimensioni (Principal Component, PC) attraverso una rotazione degli assi dello spazio multidimensionale in modo da orientarli coerentemente con i *pattern* di dispersione dei dati stessi [20]. La CCA (Canonical Correspondence Analysis) è una tecnica multivariata che consente di evidenziare le relazioni tra le comunità biotiche e il loro ambiente [21]. La GPA (Generalized Procrustes Analysis) è una tecnica che consente mediante delle trasformazioni (es. rotazioni, traslazioni, dimensionamenti) di identificare la configurazione di consenso tra due (o più) matrici di dati [22]. E' una tecnica alquanto potente per identificare eventuali associazioni tra matrici diverse in particolare quando il numero delle osservazioni è elevato [23].

## ✓ **I lombrichi**

All'interno di un programma creato da ADME (French Environment and Energy Management Agency) sono stati valutati 80 parametri biologici del suolo, con lo scopo di riempire la grande lacuna costituita dal fatto che, nonostante fosse chiara la necessità di possedere attributi biologici da inserire nelle reti di monitoraggio, fino al 2009 ancora gli strumenti a disposizione e con una validazione fossero scarsi. I parametri valutati erano costituiti da microrganismi, flora e fauna del suolo. La valutazione si basava su: diversità biologica, attività, capacità di bioaccumulo e funzione di biomarker per inquinanti. Da questa prima selezione se ne è condotta una seconda che teneva in considerazione la capacità di rispondere al tipo di gestione del suolo, al grado di contaminazione ed alla qualità del suolo. Da questo secondo step è emerso che i lombrichi sono buoni indicatori per diversi motivi. Essi infatti sono ben rappresentati in termini di densità nei vari suoli, rispondono a cambiamenti ambientali derivanti da gestione agricola e forestale e, avendo un grosso impatto sul suolo, sono indicatori ottimali del suo funzionamento.

Ciò che dei lombrichi può essere usato come indicatore di qualità del suolo, a livello di comunità, è l'abbondanza (legata al tipo di uso del suolo); la ricchezza in specie e la struttura ecologica (abbondanza di gruppi ecologici presenti), sono indicatori del tipo di fertilizzazione e dell'uso di agrofarmaci. Gli obiettivi di questo lavoro erano di valutare il range di risposta dei lombrichi a livello di individuo e di comunità, a modifiche ambientali derivanti dall'aggiunta di ammendanti organici, contaminazione da metalli pesanti, ed IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici); testare diversi descrittori quali l'abbondanza totale e la struttura ecologica. Per fare ciò sono stati presi in considerazione cinque siti appartenenti a tre diverse categorie: un sito forestale, un sito coltivato ed uno contaminato. Queste tre categorie avevano poi 5 tipi di uso differenti: forestale, arabile, pascolo, discarica, bosco). Da questo studio è emerso che, l'aggiunta di ammendanti organici di diversa composizione arricchisce la popolazione di lombrichi in abbondanza, favorendo i gruppi ecologici che stanno in profondità. La presenza di contaminazione da metalli diminuisce il numero di individui, senza però evidenziare delle relazioni fra abbondanza e livello di contaminazione; inoltre, i gruppi ecologici ipogeici subiscono impatto, mentre aumentano quelli epigei. Anche la presenza di IPA affetta gravemente l'abbondanza [12].

Il progetto ENVASSO (ENVironmental ASsessment of Soil for mOnitoring Project) è stato creato dalla commissione europea per valutare e creare indicatori che fossero utili per implementare la Thematic Strategy for Soil Protection. In tale progetto i lombrichi sono stati definiti "ingegneri dell'ecosistema", e sono stati scelti quali indicatori rilevanti nel riconoscere le minacce per il suolo. La ragione per la quale sono stati scelti risiede nel fatto che essi sono implicati nell'evoluzione della fertilità del suolo, attraverso l'influenza che hanno nel riciclo della sostanza organica, e sulla struttura fisica, la permeazione dell'acqua e la capacità di ritenzione idrica [34,35].

La distribuzione dei lombrichi è influenzata da qualità intrinseche del suolo (pH, tessitura, profondità...) ed è fortemente mitigata dal tipo di uso (pratiche agricole, fertilizzazione), ma anche dalla contaminazione dovuta da varie sostanze inquinanti. A seconda del livello di disturbo, le comunità di lombrichi possono essere influenzate nella densità, nella biomassa, nella diversità tassonomica o nella struttura funzionale [36]. La modificazione di quest'ultima, in termini di perdita di una categoria ecologica fornisce informazioni circa l'alterazione delle funzioni del suolo che sono controllate dai lombrichi.

Gli indici di biodiversità indagati erano:

- indice di diversità di Shannon-Wiener ( $H'$ );
- evenness di Pielu ( $J$ ).

Il confronto dei dati relativi ai vari parametri dei lombrichi (densità, biomasse) è stato effettuato attraverso test non parametrici al livello di confidenza del 95%: Kruskal-Wallis (K&W) per comparazione multipla e Mann-Whitney (M&M) per una comparazione post-hoc dopo il test di significatività di Kruskal-Wallis. La ricerca mirava a sottolineare lo stato del potenziale impatto di ciascuna attività industriale sulla comunità dei lombrichi ed era volta a determinare i parametri rilevanti delle comunità di lombrichi che possano costituire dei bioindicatori ottimali per il monitoraggio dei suoli lombardi.

### ✓ Caratterizzazione delle attività enzimatiche e delle comunità microbiche del suolo

L'attività enzimatica del suolo costituisce un biosensore ambientale capace di rispondere velocemente alle sollecitazioni causate da fattori chimici, fisici e nutrizionali, inclusi gli effetti della gestione del terreno. Molto spesso sono capaci di indicare anche quanto velocemente questi effetti si manifesteranno [37]. Essi richiedono in genere tempi brevi o comunque abbastanza accettabili per la loro determinazione utilizzando tecniche standard e sono abbastanza economici da poter essere utilizzati su ampia scala. Ne consegue che si rivelano particolarmente utili nel monitoraggio del suolo per valutare gli effetti dei fattori soprammenzionati nei riguardi di variazioni di fertilità, di inquinamento, di fattori naturali incidenti sull'attività biologica, ecc.

Le diverse attività enzimatiche del suolo indicano la capacità di questo comparto ambientale nel degradare o trasformare determinati substrati [38], inclusi determinati componenti della sostanza organica del suolo e del "grado di funzionamento" di quest'ultimo nei diversi cicli biogeochimici.

Nel presente progetto di monitoraggio, le attività enzimatiche determinate sono 9, sia in fase generale che per quanto riguarda le sette aree della seconda fase; si tratta di fosfomonoesterasi acida, fosfodiesterasi, pirofosfato-fosfodiesterasi, leucina amminopeptidasi, arisulfatasi, chitinasi, betaglucosidasi, acetato esterasi, fosfomonoesterasi alcalina.

Anche la caratterizzazione delle comunità microbiche del suolo costituisce un approccio integrativo che permette di stabilire l'integrità ecosistemica od il suo livello di disturbo, la qualità dei siti ed il grado di trasformazione dei processi nei suoli [15].

L'importanza della comunità microbica in questo ambito è dovuta al fatto che essa costituisce un fondamentale punto di passaggio per la sostanza organica che giunge al suolo. Oltre alle dimensioni anche le sue funzioni e diversità strutturale sono rilevanti: un'elevata differenziazione è indice di un ecosistema in salute; se così non fosse non si avrebbero risposte adeguate ai cambiamenti ambientali [11].

I microrganismi del suolo svolgono un ampio raggio di funzioni ecologiche significative ed essenziali per un normale suolo in salute. Essi hanno un ruolo chiave nei flussi energetici, nella trasformazione degli elementi nutritivi e nei cicli degli elementi. Uno stato ottimale dei microrganismi in termini di quantità, attività e diversità è un requisito fondamentale per la qualità del suolo, la sua fertilità e la tolleranza ai fattori di stress. Certi cambiamenti nei parametri microbici costituiscono le prime avvisaglie di decrescita nella qualità del suolo [39]. Per questo tali parametri ne sono potenzialmente dei buoni mezzi diagnostici. La rilevazione dello stato delle attività di specifiche comunità microbiche in termini strutturali e metabolici, fornisce rapide e sensibili spiegazioni circa le caratteristiche dei cambiamenti dello stato qualitativo del suolo. Per esempio si hanno risposte sensibili ai cambiamenti di gestione del suolo e possono inoltre fornire dati sullo stato di resilienza allo stress [40].

Studi sulle proprietà delle comunità microbiche vengono condotti a livello di biomassa, ovvero esprimendo la quantità di microrganismi in termini di massa di carbonio immobilizzato nelle cellule microbiche. La biomassa microbica è una



misura diretta di quantità microbica, indipendentemente dallo stato fisiologico delle cellule [3], è un indicatore sensibile ai cambiamenti rispetto alle analisi chimiche e s'inserisce in un progetto di monitoraggio con un'ottica olistica.

Il  $C_{bio}$  è il rapporto tra il C della biomassa microbica e il carbonio organico, ed è stato proposto come indice dei cambiamenti nel suolo, in quanto la biomassa microbica risponde rapidamente per esempio alla degradazione. Questo valore di carbonio è un precoce indicatore di grandi cambiamenti negli input di carbonio dovuti all'inquinamento o all'incorporazione di residui colturali [41]. Variazioni nella frazione viva di carbonio possono essere dovute alle pratiche agricole come l'aratura, alla contaminazione ed ai cambiamenti climatici. Va comunque ricordato che differenze fra biomassa microbica di due siti non indicano necessariamente differenza di qualità e che fattori climatici possono mascherare, per esempio, effetti dovuti alle diverse pratiche agricole. Per questo occorre considerare contemporaneamente più di un indicatore [3].

La funzionalità dei microrganismi viene valutata attraverso la respirazione basale e potenziale. Attività come la respirazione vengono misurate senza specificare il gruppo o la diversità microbica [39]. Essa indica la capacità ossidativa, ed è influenzata dall'energia disponibile e dalla quantità di microrganismi [3].

In generale, alti valori di  $C_{bio}$  e tassi di respirazione alti indicano un miglior stato dei microrganismi del suolo. Tuttavia, se la respirazione è elevata a livelli anomali rispetto alla della biomassa microbica presente, questo può indicare uno stress risultante da una accresciuta richiesta di energia. La respirazione basale è fortemente influenzata dalla mancanza o dall'eccesso di disponibilità di carbonio nel suolo. È inoltre possibile utilizzare il  $C_{ext}$  per valutare la situazione circa il substrato di carbonio disponibile nel suolo: si tratta della frazione dinamica di carbonio organico, strettamente collegata ai cambiamenti nelle attività microbiche [39]. Elevati tassi di respirazione possono essere osservati in presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti. La respirazione microbica poi è molto variabile e dipende dal tasso di umidità del suolo, dalla temperatura, e dal substrato; di conseguenza, misurare la sua variabilità può risultare di difficile interpretazione in termini di qualità del suolo e sua salute [6].

Secondo quanto appena affermato ci sono ancora dei dubbi circa l'interpretazione delle risposte che si ottengono [39], e vista la difficoltà ad attribuire un significato esatto a queste informazioni, è assolutamente opportuno abbinare i dati ad altri parametri di attività microbica [40]. Per questo motivo, la respirazione basale viene relazionata alle unità di biomassa microbica per formare il coefficiente  $qCO_2$ , quoziente metabolico, che descrive il substrato mineralizzato per unità di carbonio della biomassa microbica e si basa concettualmente sulla teoria di Odum della successione ecosistemica, come indice del suo livello di maturità [3]. Esso cresce in caso di suoli stressati, ma anche in caso di suolo con eccesso di sostanza organica. Per questo sarebbe utile possedere una serie di dati per studiare il divenire di questo parametro. Da esso si ottengono informazioni sui cambiamenti strutturali e sul funzionamento della comunità microbica del suolo in generale: il  $qCO_2$  è stato spesso usato per stabilire lo stato fisiologico della comunità del suolo. Una condizione di stress può però anche determinarne una diminuzione, a causa della riduzione di efficienza di conversione del substrato a carbonio (C) della biomassa microbica; può anche essere sintomo di un cambiamento nella struttura microbica con passaggio da individui a strategia r con elevato tasso di crescita e bassa biomassa, ad individui a strategia K i quali hanno una taglia di popolazione costante e maggiore efficienza nel consumo della biomassa [3]. Nei campi coltivati a mais monoculturale, ma anche in caso di rotazione di colture, si nota un abbassamento del numero di individui, dei ceppi e della diversità, assieme alla tendenza a promuovere lo sviluppo di individui a strategia r, che si basano sulla mineralizzazione della sostanza organica prontamente disponibile. Laddove vi sono pascoli, le comunità possiedono un più alto potenziale metabolico, ma la prevalenza è sempre di individui a strategia r [15]. Cambiamenti nella gestione del suolo possono indurre variazioni nel quoziente metabolico; per esempio la rotazione colturale, rispetto

alla monocoltura, può abbassare il  $qCO_2$ , mentre alti valori sono stati trovati laddove si fanno aggiunte di sostanza organica. Questo però dipende anche dal livello di stress dal punto di vista degli elementi nutritivi disponibili, rivelando cioè abbassamenti in condizioni di carenza di elementi nutritivi. Inoltre, questo indice è stato spesso usato come ottimo indicatore delle alterazioni che hanno luogo nel suolo dovute alle contaminazioni da metalli pesanti. È però stato criticato per la sua insensibilità ad alcuni disturbi e sviluppi ecosistemici [3].

Anche le attività enzimatiche possono essere usate come indicatori. La più usata è l'attività della deidrogenasi, indice generale dell'attività microbica, correlata all'ossidazione dei composti organici. La presenza di "carburanti" ha il maggior effetto negativo sia sul C della biomassa microbica che sull'attività enzimatica [3].

E' comunque estremamente difficile utilizzare i valori forniti dai parametri microbiologici poiché i microrganismi del suolo reagiscono molto rapidamente anche a variazioni stagionali e si adattano alle diverse necessità ambientali. Perciò diventa problematico distinguere fluttuazioni naturali da alterazioni causate da attività antropiche, specialmente quando il dato viene determinato sprovvisto di controllo. Diversi autori hanno proposto vari suggerimenti. Brookes [42], ad esempio, afferma che nessun indicatore dovrebbe essere utilizzato da solo, ma unitamente ad altri parametri correlati da utilizzare insieme come "controllo interno", es. C della biomassa e C organico totale del suolo. Quando i suoli presentano marcate variazioni rispetto a ciò che è considerato il valore "normale" in un particolare sistema di gestione del suolo, clima e tipo di suolo, tale valore diventa un indicatore del deterioramento e del cambiamento nelle funzioni dell'ecosistema suolo. Infatti c'è una relazione quasi lineare tra queste due variabili, anche se ci possono essere rilevanti discrepanze tra suoli con diverse caratteristiche fisiche o suoli gestiti in modo diverso. Molti studi sono stati condotti circa la possibilità di utilizzare i parametri microbiologici e biochimici del suolo per caratterizzare la diversità microbica sia in termini genetici che funzionali definendo innanzitutto se c'è vita nel suolo oppure no ed il suo ordine di grandezza, quindi è di fondamentale importanza capire quanto la popolazione vivente sia attiva e quali funzioni svolga. Da quanto sino ad ora discusso appare evidente che, sia pure con una certa difficoltà e con un certo margine di approssimazione, è possibile definire la diversità microbica di un suolo e di darne una caratterizzazione in termini di fluttuazioni naturali o non, seppur non in maniera diretta ed assoluta.

In questo progetto, quindi, per ciascun campione di suolo sono state determinate sia la carica microbica (C della biomassa) che la relativa attività respirometrica (mediante determinazione della  $CO_2$  emessa), considerati indicatori di qualità e fertilità del suolo. Integrando questi risultati con i valori di C organico del suolo è stato possibile ottenere dei quozienti: di mineralizzazione (qM), metabolico ( $qCO_2$ ) e di efficienza microbica (qMic), che hanno permesso di determinare un indice sintetico di fertilità biologica (Ibf) in grado di rappresentare lo stato di salute di un suolo [43].

La *Tabella 1* mostra i diversi punteggi assegnati ai parametri analizzati a seconda dei valori ottenuti. La somma di tali punteggi corrisponde ad una delle classi di fertilità elencate in *Tabella 2*.

*Tabella 1. Punteggi assegnati a differenti intervalli di valori dei parametri*

Parametri	Punteggi				
	1	2	3	4	5
Carbonio Organico (% m/m)	<1	1 – 1,5	1,5 – 2	2 – 3	>3
Respirazione basale (mg kg <sup>-1</sup> )	<5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	>20
Respirazione cumulativa (mg kg <sup>-1</sup> )	<100	100 – 250	250 – 400	400 – 600	>600
C microbico (mg kg <sup>-1</sup> )	<100	100 – 200	200 – 300	300 – 400	>400
Quoziente metabolico (10 <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	>0,4	0,3 – 0,4	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	<0,1
Quoziente di mineralizzazione (% m/m)	<1	1 – 2	2 – 3	3 – 4	>4

Tabella 2. Scala di classi in funzione dell'indice di fertilità biologica (IBF)

Classi di fertilità	I	II	III	IV
IBF	Bassa - stress 6-12	Media 12-18	Buona 18-24	Alta 25-30

#### IV. La valutazione dei risultati ottenuti mediante lo sviluppo di grafici radar

La multidisciplinarietà del progetto sviluppato necessita alla fine di un sistema che consenta di valutare i risultati ottenuti, considerando contemporaneamente tutti gli ambiti affrontati.

Abbiamo così deciso di ricorrere allo sviluppo di grafici a radar, che consentono di avere un sguardo di insieme efficace su quanto ottenuto. Per ogni area sono stati creati tre grafici corrispondenti agli EPT, agli inquinanti organici ed agli indicatori biologici, determinando delle classi entro cui far ricadere i valori (da 1 a 4 o da 1 a 5).

La Tabella 1.1 riporta i parametri presi in considerazione per quanto riguarda gli inquinanti organici e gli indicatori biologici.

Tabella 1.1. Parametri biologici e chimici indagati e relative classi di valutazione

SIGLA	PARAMETRO	CLASSI				
		1	2	3	4	5
<b>g.R</b>	genotossicità radicale	Non genotossico	Moderatamente e genotossico	Genotossico	Altamente genotossico	-
<b>g.F</b>	genotossicità fogliare	Non genotossico	Moderatamente e genotossico	Genotossico	Altamente genotossico	-
<b>g.P</b>	genotossicità per la pianta	Non genotossico	Moderatamente e genotossico	Genotossico	Altamente genotossico	-
<b>IBF</b>	indice fertilità biologica	Alta	Buona	Media	Bassa- stress	-
<b>P-H'</b>	Indice Shannon protozoi	>3,5	2,5 – 3,5	1,5 – 2,5	0 – 1,5	-
<b>P-J</b>	indice evennes protozoi	0,75 - 1	0,5 – 0,75	0,25 – 0,5	0 – 0,25	-
<b>L--H</b>	Indice Shannon lombrichi	>3,5	2,5 – 3,5	1,5 – 2,5	0 – 1,5	-
<b>L-J</b>	Indice evennes lombrichi	0,75 - 1	0,5 – 0,75	0,25 – 0,5	0 – 0,25	-
<b>E</b>	Esterasi	>174612	174612 - 85531	85531 - 48192	< 48192	-
<b>L</b>	Leucina aminopeptidasi	> 1905	1905 - 1359	1359 - 767	< 767	-
<b>β</b>	Betaglucosidasi	>420	420 - 293	293 - 168	< 168	-
<b>DIOX</b>	Diossine (pg I-TEQ g <sup>-1</sup> )	<2,4	2,4 - 10	10 - 55	55 - 100	>100
<b>DL PCB</b>	Bifenil policlorinati Dioxin-like (WHO <sub>05</sub> -TEQpg g <sup>-1</sup> )	< 0,61	0,61 - 10	10 - 55	55 - 100	>100
<b>PCB</b>	Bifenil policlorinati (ng g <sup>-1</sup> )	< 8,9	8,9- 60	60 - 2470	2470 - 5000	> 5000
<b>DDT</b>	Pesticidi (ng g <sup>-1</sup> )	< 3,5	3,5 - 10	10 - 1005	1005 - 2000	> 2000
<b>R.F.</b>	Ritardanti di fiamma BFR (ng g <sup>-1</sup> )	<3,6	3,6 - 60	60 - 2470	2470 - 5000	> 5000

Per quanto riguarda le attività enzimatiche prese in considerazione nei risultati, i valori usati per costruire le classi derivano dall'analisi statistica dei dati relativi ai 156 campioni di suolo della prima fase. La soglia della classe 4 è costituita dal valore relativo al 95° percentile. Nei radar abbiamo deciso di rappresentare l'attività relativa all'acetato

esterasi, alla betaglucosidasi ed alla leucina aminopeptidasi in quanto la prima rappresenta una risposta più generica, la seconda è potenzialmente legata alla presenza elevata di alcuni metalli pesanti, e l'ultima perché connessa al ciclo dell'azoto. Per gli inquinanti organici abbiamo inserito una classe in più, in quanto si è pensato di individuare anche in questo caso il valore relativo al 95° percentile fra i dati ricavati dall'intera regione. Questo ha permesso di capire quale fosse la distribuzione di tali sostanze a livello regionale ed il loro livello nelle zone da noi considerate nella seconda fase. Il 95° percentile ha costituito la soglia della prima classe, mentre la seconda e la quarta fanno riferimento ai limiti imposti dal D.Lgs. 152/06, valore tabellare A per la seconda classe e B per la quarta. A metà fra i due è stata disposta la terza classe. Occorre sottolineare che il 95% dei dati ottenuti per l'intera regione si dispone ben al di sotto del valore di soglia di contaminazione più restrittivo previsto dalla legge.

Le categorie dei composti diossino-simili (DL PCB) e dei ritardanti di fiamma bromurati (BFR) non sono invece normate in Italia; si è quindi pensato di considerare i limiti imposti alle diossine per i primi, e quelli relativi ai PCB per i secondi, accomunandoli in questo modo ai composti il cui comportamento e la cui struttura è a loro più simile.

Per gli Elementi Potenzialmente Tossici la prima e la quarta classe corrispondono ai limiti A e B del D.Lgs. 152 del 2006.

## **V. Applicazione di un biosensore luminescente per la valutazione della tossicità da diossina e composti diossino-simili**

Un'ulteriore saggio sperimentato nella seconda fase del progetto, ma che esulava dalla costruzione dei grafici a radar per la valutazione finale, è consistito nell'applicare un biosensore luminescente che permettesse di stimare la tossicità di composti diossino-simili e diossine eventualmente presenti. Si trattava del DR-CALUX, (Dioxin-Responsive Chemically Activated LUCiferase eXpression) un biosensore che permette di determinare la presenza e la tossicità di composti con attività diossino-simile, anche presenti in miscele, in diverse matrici ambientali ed alimentari. È stato sviluppato a partire da cellule di carcinoma epatico di topo (linea cellulare H1L6.1) o di ratto (linea H4IIE), nelle quali è stato inserito il gene responsabile della produzione di luciferasi sottoposto al controllo del gene DRE (Dioxin-responsive element). Il DR-CALUX si basa su un sistema "Meccanismo-specifico" e non "Composto-specifico": il contributo di ciascun congenere è espresso in termini di un equivalente quantità di 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p diossina (2,3,7,8-TCDD) che risulta in un uguale livello di attivazione del recettore Aril-idrocarbonico. Per queste caratteristiche, DR-CALUX è in grado di misurare l'effetto sinergico o antagonistico dei composti diossino-simili, che coesistono in complesse miscele di congeneri e che possono modulare il loro effetto tossico [44]. Con il DR-Calux è possibile determinare il TEQ (Toxic Equivalency o Equivalenza Tossica), che viene calcolato come somma dei livelli di ogni sostanza ponderati per i relativi TEF (Toxic Equivalency Factor):

$TEQ = \sum[(PCDD_i \times TEF_i) + (PCDF_i \times TEF_i) + (PCB_i \times TEF_i)]$  (dove i indica la sostanza i-esima).

Il valore di TEQ esprime la tossicità come se tutta la miscela fosse composta da 2,3,7,8-TCDD.

La formula si applica a PCDD, PCDF, PCB coplanari e PCB orto-sostituiti (non agli altri PCB), mentre non viene applicato per alcune sostanze anch'esse capaci di interagire con il recettore Aril-idrocarbonico, come gli idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), le dibenzo-p-diossine bromurate (PBDDs) ed i dibenzofurani polibromurati (PBDFs) [45].

Si è pertanto proposto di nominare BEQ il valore di TEQ ottenibile attraverso biosensori cellulari come il DR-Calux [46]. Il DR-Calux è solitamente applicato a campioni che hanno subito un'estrazione esaustiva dei contaminanti.

Tuttavia, tale approccio non permette di considerare l'importanza della biodisponibilità e di conseguenza della frazione di contaminanti non disponibile perché strettamente legata alle particelle del suolo [47]. Nel caso delle diossine e dei furani, alcune stime riportano che circa il 30% di questi composti presenti in un suolo siano disponibili per organismi viventi [48]. Oltre ad un'estrazione esaustiva dei contaminanti oggetto di studio, è stata anche eseguita un'estrazione volta a quantificare la frazione biodisponibile. L'estrazione esaustiva è stata eseguita ricorrendo al metodo "Soxhlet", mentre la frazione biodisponibile è stata estratta utilizzando il polimero Tenax (2,6-diphenyl-p-phenylene oxide, la cui capacità di trattenere molecole altamente idrofobiche (PCBs PCDDs e PCDDF, PBDEs) che passano in soluzione acquosa è stata dimostrata da numerosi studi riguardanti le cinetiche di desorbimento [49, 50, 51, 52]. Il tempo di estrazione necessario per la frazione biodisponibile è inferiore a quello necessario per la frazione totale. La fase che si rende più rapidamente disponibile per gli organismi viventi può essere determinata entro sei ore [53, 54]. I valori di BEQ ottenuti dai campioni sottoposti alle differenti estrazioni sono stati calcolati e confrontati.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] Commissione delle Comunità Europee (2006) - Strategia tematica per la protezione del suolo. COM(2006)231 definitivo;
- [2] DECRETO LEGISLATIVO 29 giugno 2010, n. 128. Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, a norma dell'articolo 12 della legge 18 giugno 2009, n. 69;
- [3] Bastida F, Zsolnay A, Hernández T, García C, Review. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective; "Geoderma", 2008, n.147, p. 159-171;
- [4] Larson WE, Pierce FJ. Conservation and enhancement of soil quality. In: Dumanski, J. (Ed.), Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World. Proceedings of the International Workshop, Chiang Rai, Thailand, 15- 21 Sept. 1991. Technical papers, vol. 2. Int. Board for Soil Res. and Management, Bangkok, Thailand, pp. 175- 203.
- [5] Filip Z. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. "Agriculture, Ecosystems and Environment", 2002, n. 88, p.169-174;
- [6] Knoepp JD, Coleman DC, Crossley Jr DA, S.Clark J. Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. "Forest Ecology and Management", 2000, n.138, p. 357-368;
- [7] Karlen DL, Ditzler CA, S. Andrews S. Soil quality: why and how? "Geoderma", 2003, n. 114, p.145- 156;
- [8] Garbisu C, Alkorta I, Epelde L. Viewpoint. Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. "Applied Soil Ecology", 2011, n.49, p.1- 4;
- [9] Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. "Soil Biology & Biochemistry", 2005, n.37, p.877-887;
- [10] van Bruggen AHC, Semenov AM. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. "Applied Soil Ecology", 2000, n.15, p.13-24;
- [11] Böhme L, Langer U, Böhme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. "Agriculture, Ecosystems and Environment", 2005, n.109, p.141-152;
- [12] Pérès G, Vandenbulcke F, Guernion M, Hedde M, Beguiristain T, Douay F, Houot S, Piron D, Richard A, Bispo A, Grand C, Galsomies L, Cluzeau D. 9<sup>th</sup> International Symposium on Earthworm Ecology. Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). "Pedobiologia", 2001, n.54S, p. S77-S87;
- [13] Pierzynski GM, Sims JT, Vance GF (Eds.), 1994. Soils and Environmental Quality. Lewis Publishers, Boca Raton, USA;
- [14] Nortcliff S. Standardisation of soil quality attributes. "Agriculture, Ecosystems and Environment", 2002, n. 88, p.161-168;
- [15] Fränzle O. Complex bioindication and environmental stress assessment. "Ecological Indicators", 2006, n.6, p.114-136;
- [16] Arshad MA, Martin S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. "Agriculture, Ecosystems and Environment", 2002, n. 88, p.153-160;
- [17] Gadzała-Kopciuch R, Berecka B, Bartoszewicz J, Buszewski B. Review Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitoring. "Polish Journal of Environmental Studies", 2004, Vol. 13, n.5, p. 453-462;
- [18] Deml E and Oesterle D: La cancerogenesi chimica, in: Tossicologia a cura di Greim H and Deml E, Zanichelli, 2002;
- [19] Klaassen CD In: Casarett and Doull's Tossicology: The Basic Science of Poisons, 5th ed; Klaassen CD, Ed McGraw-Hill Companies: New York, 1995, p. 199-267;
- [20] Beyersmann D and Hartwig A: Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. "Archives of Toxicology", 2008, n.82(8), p. 493-512;
- [21] Wang W, Freemark K: The use of plants for environmental monitoring and assessment. "Ecotoxicology and Environmental Safety", 1995, n.30, p. 289-301;
- [22] Minissi S, Lombi E: Heavy metal content and mutagenic activity; evaluated by Vicia faba micronucleus test, of Tiber river sediments. "Mutation Research", 1997, n.393, p. 17-21;
- [23] Citterio S, Aina R, Labra M, Ghiani A, Fumagalli P, Sgorbati S, Santagostino A: Soil genotoxicity assessment: a new strategy based on biomolecular tools and plant bioindicators. "Environmental Science & Technology", 2002 n.36, p. 2748-2753;

- [24] Finlay BJ: Protozoa. *Encyclopedia of Biodiversity* 4: 901–915, 2001;
- [25] Clarholm M: Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *“Soil Biology and Biochemistry”*, 1985, n.17, p.181–187;
- [26] Clarholm M, Bonkowski M and Griffiths B: Protozoa and Other Protista in Soil. In *Modern Soil Microbiology*” CRC Press, USA, 2006;
- [27] Luftenegger G, Foissner W e Adam H: r- and k-selection in soil ciliates: a field and experimental approach. *“Oecologia”* 1985, n. 66, p. 574–579;
- [28] Sauvant MP, Pepin ND e Piccinni E: Tetrahymena piriformis. A tool for toxicological studies. A review. *“Chemosphere”* 1999, n. 38, p.1631-1669;
- [29] La Terza A, Barchetta S, Buonanno F, Ballarini P, Miceli C: Development and application of whole cell biosensors based on recombinant cell lines of ciliated protozoan Tetrahymena thermophila for ecotoxicity screening. In: Cenci RM e Sena F: BIO-BIO project – Biodiversity-Bioindication to evaluate soil health.2006;
- [30] Petz W e Foissner W: The effects of mancozeb and lindane on the soil microfauna of a spruce forest: a field study using a completely randomized block design. *“Biology and Fertility of Soils”* 1989, n.7, p. 225-231;
- [31] Lara E, Berney C, Harms H, Chatzinotas A: Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. *“FEMS Microbiology Ecology”*. 2007, n.62, p. 365-373
- [32] Foissner W: Soil protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides and biodiversity. *“Agriculture, Ecosystem and Environment”* 1997, n.62, p. 93-103;
- [33] Ekelund F, Olsson S e Johansen A: Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soils spiked with a range of copper concentration. *“Soil Biology and Biochemistry”*, 2003, p. 1507-1516;
- [34] Lee KE: Earthworms – their ecology and relationships with soils and land use. Academic Press, New York, 1985;
- [35] Edwards CA and Bohlen PJ: *Biology and Ecology of Earthworms*, 3rd ed., Chapman and Hall, London, UK, 1996;
- [36] Spurgeon DJ and Hopkin, SP: Seasonal variation in the abundance, biomass and biodiversity of earthworms in soils contaminated with metal emissions from a primary smelting works. *“Journal of Applied Ecology”*, 1999, n.36, 173-183;
- [37] Dick RP, Burns RG. A brief history of soil enzymology research. In: Dick R. *Methods of soil enzymology*. Soil Science Society of America, Madison, USA. 2011;
- [38] Dick RP, Breakwell DP, Turco RF. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: *Methods for assessing Soil Quality*. SSSA Special publication 49. Madison, USA. 1996;
- [39] Hofman J, Bezchlebová J, Dusěk L, Doležal L, Holoubek I, Anděl P, Ansorgová A, Maly S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. *“Environment International”*, 2003, n.28, p.771– 778;
- [40] Bending GD, Turner MK, Rayns F, Marx MC, Wood M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *“Soil Biology & Biochemistry”*, 2004, n. 36, p.1785–1792;
- [41] Hargreaves PR, Brookes PC, Ross GJS, Poulton PR. Evaluating soil microbial biomass carbon as an indicator of long-term environmental change. *“Soil Biology & Biochemistry”*, 2003, N. 35, p. 401–407;
- [42] Brookes PC. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *“Biology and Fertility of Soils”*, 1995, n.19, p. 269-279;
- [43] Benedetti A, Dell’Abate MT, Mocali S, Pompili L (2006). Indicatori microbiologici e biochimici della qualità del suolo. In: *ATLAS - Atlante di Indicatori della Qualità del Suolo*. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Osservatorio Nazionale Pedologico. Edizioni Delta Grafica, Città di Castello (Perugia);
- [44] Joung KE, Chung YH and Sheen YY. DRE-CALUX bioassay in comparison with HRGC/MS for measurement of toxic equivalence in environmental samples. *“Science of The Total Environment”*, 2007, n.372, p. 657–667;
- [45] Van Den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N and Peterson RE. The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *“Toxicological Sciences”*, 2006, n. 93, p. 223–241;
- [46] Hädrich J, Eppe G, Goeyens L, Hoogenboom LA, Malagocki P, Scippo P,(2010). New cut-off values for application in bionalytical screening: decision over sample compliance with legal limits set by the European Union for PCDD/Fs and dioxin-like PCBs. *Organohalogen Compound*, 72;
- [47] Martin A. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *“Environmental Science & Technology”* , 2000, Vol.34, n.20, p.4259-4265;
- [48] Paustenbach DJ, Fehling K, Scott P, Harris M and Kerger BD. 2006. Identifying soil cleanup criteria for dioxins in urban residential soils: How have 20 years of research and risk assessment experience affected the analysis? *“Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B. Critical Reviews”*. 9(2) p.87-145;
- [49] Cornelissen G, van Noort PCM, and Govers HAJ. Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: Sediment extraction with Tenax® and effects of contact time and solute hydrophobicity. *“Environmental Toxicology and Chemistry”*, 1997, n.16, p.1351–1357;
- [50] Trimble TA, You J, Lydy MJ. Bioavailability of PCBs from field collected sediments: Application of Tenax extraction and matrix-SPME techniques. *“Chemosphere”*, 2008, Vol. 71, n.17, p. 337-344;
- [51] Sormunen AJ, Koistinen J, Leppänen MT and Kukkonen JVK. Desorption of sediment-associated polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, diphenylethers and hydroxydiphenyl ethers from contaminated sediment. *“Chemosphere”*, 2008, n.72, p. 1-7;
- [52] de la Cal A, Eljarrat E, Grotenhuis T, and Barcelo D. Tenax® extraction as a tool to evaluate the availability of polybrominated diphenyl ethers, ddt, and ddt metabolites in sediments. *“Environmental Toxicology and Chemistry”*, 2008, n.27, p. 1250–1256;

- [53] Ten Hulscher D, Postma J, Den Besten PJ, Stroomborg GJ, Belfroid A, Wegener JW, Faber JH, Van der Pol JC, Hendriks AJ, Van Noort PCM. Tenax extraction mimics benthic and terrestrial bioavailability of organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, Vol. 22, n.10, p. 2258-2265;
- [54] Van Noort PCM. Estimation of amorphous organic carbon/water partition coefficients, subcooled aqueous solubilities and n-octanol/water distribution coefficients of alkylbenzenes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, 2009b, Vol.74, n.8, p.1018-1023.
- [55] Acton DF, Padbury GA. A Conceptual Framework for Soil Quality Assessment and Monitoring. In A program to assess and monitor soil quality in Canada. Soil quality evaluation program summary. Edited by Acton DF. Research Branch Agriculture Canada 1994

# CAPITOLO 1 : IL MONITORAGGIO CHIMICO-FISICO DELLA REGIONE

## LOMBARDIA

### 1.1 Il disegno di monitoraggio

Il monitoraggio e la pianificazione ambientale non possono prescindere dalla conoscenza delle caratteristiche del suolo che ne è la parte essenziale. Attualmente vi è una crescente richiesta da parte dei funzionari politici – a livello nazionale e internazionale – di informazioni che riguardano le caratteristiche dei suoli.

I suoli agricoli sono di particolare interesse in quanto profondamente coinvolti nel tema della salute umana e ambientale. Al fine di ottenere informazioni relative agli attributi e alla qualità dei terreni agricoli della Regione Lombardia, il primo passo è stato quello di organizzare una campagna di campionamento basata su un disegno che permettesse di coprire e rappresentare al meglio tutto il territorio. La disposizione dei punti di campionamento è stata fatta basandosi su una rete georeferenziata e riconosciuta a livello europeo: la rete LUCAS (Land Use/Cover Area frame statistical Survey). Il programma LUCAS inizia nel 2001 ad opera di Eurostat. Il disegno che lo compone considera diversi parametri ritenuti rilevanti per la gestione agricola. Dal 2006 la griglia di campionamento è composta da maglie quadrate di 2 km x 2 km ricoprente tutto il territorio europeo, da cui derivano circa un milione di punti georeferenziati. Ogni punto è stato classificato secondo sette classi di uso del suolo mediante il supporto di immagini satellitari [1].

A partire dai preesistenti punti LUCAS presenti in Lombardia è stata operata una selezione casuale con l'applicazione di alcune restrizioni, in modo che i punti scelti ricadessero in aree prevalentemente agricole. Per fare ciò ci si è avvalsi di un modello di campionamento noto con il nome di *Latin Hypercube Sampling*, metodo adatto alla valutazione della bontà della strategia. Si tratta di un disegno di campionamento “a strati” che permette di rappresentare al meglio la distribuzione delle variabili considerate. Nel nostro caso tali variabili sono costituite da: altezza, pendenza, orientamento della pendenza, curvatura della pendenza e uso del suolo. Esse vengono definite covarianti e costituiscono dei *layers* da sovrapporre in modo da ottenere un'unica rappresentazione completa dei dati. Per incrementare le informazioni circa l'uso del suolo già contenute nella rete LUCAS cercando di individuare al meglio la variabilità spaziale, si è ricorsi al CORINE LANDCOVER 2000 (ISPRA) [2], che possiede una risoluzione spaziale di 1000 m. L'obiettivo era calcolare la percentuale di area destinata a ogni specifico uso di suolo, per poi assegnarvi un adeguato numero di punti di campionamento. Per quanto riguarda l'elevazione del terreno si è ricorsi al SRTM 90 M (Digital Elevation Database) [3], originalmente prodotto dalla NASA, il quale offre modelli digitalizzati dell'elevazione e della copertura del terreno. Per ogni zona ritenuta adatta al campionamento è stata fornita una tripletta di coordinate WGS84 (World Geodetic System 1984), sulle quali si basa il sistema satellitare di navigazione GPS (Global Positioning System). Uno di questi tre riferimenti è stato poi scelto come punto ufficiale di campionamento. Lo scopo era di avere a disposizione un'alternativa nel caso la scelta principale fosse stata fisicamente inaccessibile. In totale, il disegno di campionamento del nostro progetto ha previsto la raccolta di 156 campioni in un'area totale di 23834 km<sup>2</sup> (**Figura 1.1**). Tale numero è derivato dalla valutazione di esperti in un'ottica di ottimizzazione di tempi e costi. La densità media dei punti di campionamento era circa un campione ogni 153 km<sup>2</sup>. La rappresentatività spaziale di un campionamento dipende anche dall'eterogeneità pedologica dell'area. Per tenere in considerazione anche quest'ultimo aspetto si è ricorsi al Soil Atlas of Europe [4]. I campioni di questo progetto sono stati prelevati ad una profondità massima di 30 cm, spazio interessato dalle lavorazioni agricole. Per quanto riguarda l'approfondimento relativo alla seconda fase del progetto, la disposizione dei punti è stata



studiata appositamente in base alla problematica ambientale specifica del sito. In questa tesi saranno descritte due delle sette aree prese in esame, in quanto in esse sono stati condotti degli ulteriori lavori di ricerca che hanno previsto l'applicazione di innovative tecniche analitiche non rientranti nelle classiche metodiche di monitoraggio. I due siti in questione sono il Sito di Interesse Nazionale (SIN) e un'area nella quale in passato si è verificata la contaminazione di cromo esavalente nelle acque sotterranee (Capitoli 2 e 3).

Durante il prelievo di ogni campione è stata redatta una scheda di campionamento, in cui si trovano il nome della località, l'altezza sul livello del mare, le coordinate geografiche, le foto scattate durante la raccolta dei campioni. Inoltre, essa contiene una serie di informazioni raccolte *in situ* volte a descrivere in maniera dettagliata il contesto ambientale (presenza di colture in campo, vicinanza di abitazioni, insediamenti industriali, strade, ferrovie, palizzate e tutto ciò che fosse ritenuto utile per descrivere l'area).

Per ogni sito d'indagine, a partire dal punto esatto individuato grazie alle coordinate, è stato costruito un quadrato di 20x20 m, suddiviso in 25 subunità di 4x4 m. Di queste ne sono state selezionate random 15, per ognuna delle quali è stata prelevata una carota di terreno del diametro di 2,6 cm e della profondità di 30 cm. La scelta di tale profondità è legata alla considerazione della porzione di terreno interessata dalle lavorazioni agricole. I 15 subcampioni sono stati uniti e omogeneizzati in campo a formare un campione composito, da trattare in laboratorio come singolo campione di campo per l'analisi. Lettieria, radici, sassi e altro materiale grossolano sono stati rimossi in campo durante le procedure di campionamento [5]

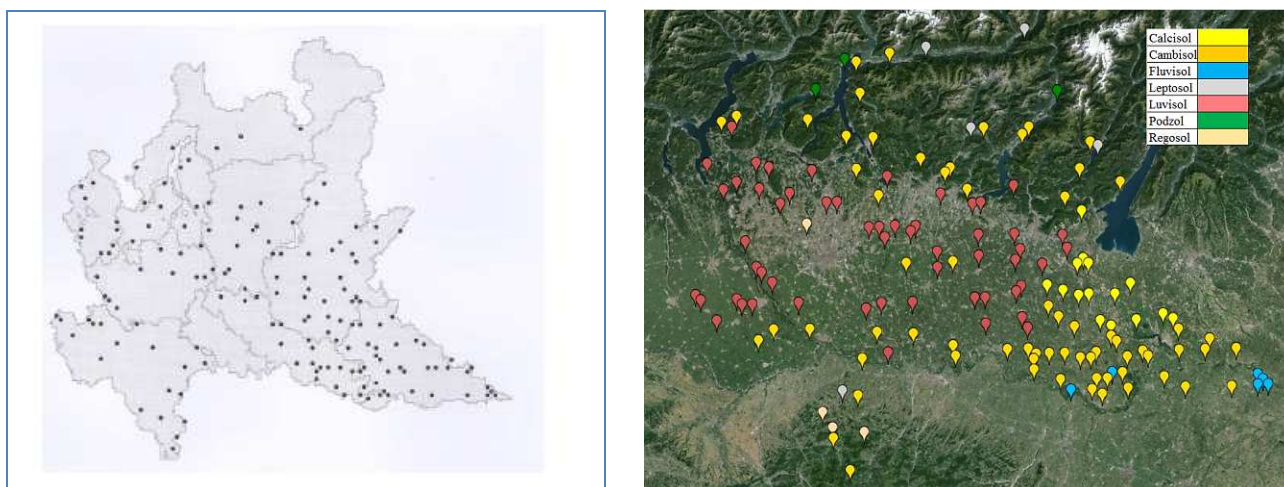


Figura 1.1. Rete dei punti del Progetto Soil Mapping (sinistra); mappa raffigurante la tipologia di suoli indagati (destra).

## 1.2 La preparazione dei campioni e le analisi effettuate

I campioni di terreno destinati alle diverse analisi vengono fatti essiccare all'aria per almeno 48 ore; in alternativa possono essere posti in stufa ad una temperatura massima di 40 °C. Una volta essiccati vengono disaggregati meccanicamente e si separa lo scheletro dalla terra fine (limite 2 mm). Un'aliquota del campione viene portata a 200 µm attraverso l'uso di un mulino planetario Micro Mill pulverisette 7 classic line (Fritsch) con sfere e giare di agata.

I campioni sono stati analizzati per determinare: il pH del suolo (grado di reazione del sistema), la tessitura (composizione percentuale delle terre fini sabbia, argilla e limo), la capacità di scambio cationico (CSC), il contenuto di carbonio totale e azoto, il calcare totale, il rapporto C/N, il contenuto totale di macroelementi (alluminio, ferro, titanio,

calcio, potassio, silicio e magnesio), la concentrazione degli Elementi Potenzialmente Tossici (EPT: arsenico, cadmio, cromo, cobalto, molibdeno, rame, zinco, vanadio, berillio, piombo, stagno, antimonio, tallio, nichel, manganese, selenio e mercurio) e la concentrazione di alcuni radionuclidi gamma-emittenti.

Dopo aver raggruppato i 156 campioni in 39 pool individuati in base al contenuto totale di mercurio, si sono eseguite le determinazioni di diossine, PCB, PCB diossino-simili, agrofarmaci clorurati e persistenti (ad esempio DDT) e ritardanti di fiamma. Questi ultimi non sono ancora stati presi in considerazione a livello normativo e di conseguenza non possiedono soglie limite di contaminazione. Il nostro obiettivo era studiarne la presenza a livello regionale. L'unico parametro biologico indagato in fase generale è costituito dalle attività enzimatiche, il cui elenco è stato inserito nell'introduzione generale. La *Tabella 1.1* riassume i parametri analizzati in questa prima fase del progetto.

*Tabella 1.1. Elenco delle analisi svolte sui 156 campioni provenienti dalla regione Lombardia*

<b>Analisi chimico-fisiche</b>	<b>pH</b>
	Tessitura
	Capacità di scambio cationico
	C tot, organico e N
	C inorganico
	Macroelementi (Fe, Ti, Al, Si, Ca, K, P, Mg, Na )
	EPT (As, Cd, Co, Mo, Sb, Se, Sn, Tl, V, Zn, Pb, Cr, Cu, Mn, Ni)
	Hg
	Radionuclidi gamma emittenti ( <sup>40</sup> K, <sup>60</sup> Co, <sup>137</sup> Cs e <sup>134</sup> Cs)
	Xenobiotici: diossine, PCBs, PCB diossino-simili, agrofarmaci organoclorurati, ritardanti di fiamma
	<b>Parametri biologici</b>
	Attività enzimatiche

## **1.3 Risultati**

I suoli investigati hanno mostrato grande variabilità. Questo è facilmente intuibile vista l'ampiezza dell'area in questione e la diversità paesaggistica.

Nella **Figura 1.2 a**) si può notare che nella parte sud-orientale della regione il pH è tendenzialmente alcalino (8,0 – 8,6) ed in particolare nelle province di Mantova, Cremona e nella parte appenninica pavese. Nel lodigiano e bergamasco i valori si spingono verso la neutralità (6,8 – 7,3). Nella parte nord-occidentale della regione invece il pH assume valori che rientrano nella categoria “subacido” (6,1 – 6,8) ed “acido” (5,5 – 6,1), specie nelle province di Varese, Monza-Brianza, Como e nella parte occidentale pavese.

L'intervallo di pH tra 6 e 7 è quello che, in generale, crea le condizioni più favorevoli alla crescita delle piante, in quanto è a questi valori che gli elementi nutritivi sono più disponibili.

Valori di pH al di sotto del 5,5 abbassano la disponibilità di Ca, Mg e P, mentre aumentano la solubilità di Al, Fe e B. Fasce di pH superiori a 8 garantiscono una maggior disponibilità di Ca e Mg, ma abbassano quella di Fe, Mn, Cu, Zn, P e B. Anche i metalli pesanti risentono dell'influenza del pH del suolo, diventando generalmente più solubili in condizioni acide; questo comporta la possibilità che elementi potenzialmente pericolosi raggiungano le acque sia superficiali che sotterranee.

Il valore del pH dipende da diversi fattori, a seconda che ci si trovi in sistemi naturali o fortemente antropizzati. Nel primo caso sono la pedologia ed il clima a determinarne i valori, mentre laddove l'attività umana è più presente, come nei sistemi agrari, i fertilizzanti e le colture incidono in maniera altrettanto importante.

Come si evince dalla **Figura 1.2 b)** il maggior contenuto in termini percentuali di argilla è dislocato fra le province di Mantova e Cremona e sull'appennino Pavese. La sabbia invece è predominante nella parte orientale e settentrionale della regione. Tali risultati sono in accordo con la distribuzione dei valori di pH già visti.

La maggior parte dei terreni campionati ed analizzati presenta un valore di Capacità di Scambio Cationico (CSC) medio (**Figura 1.2 c)**, ovvero compreso tra 10 e 20  $\text{cmol}_{(c)} \text{kg}^{-1}$  di terreno; all'interno di questa fascia prevalgono valori al di sotto del 15  $\text{cmol}_{(c)} \text{kg}^{-1}$  di terreno. Pochi campioni hanno bassa CSC ( $< 10 \text{ cmol}_{(c)} \text{kg}^{-1}$ ) e coincidono con i siti dove la sabbia costituisce la componente tessiturale preponderante. In queste zone, dove contemporaneamente coesistono valori di pH acido, prevalenza di sabbia e bassa CSC, il pericolo della disponibilità di elementi potenzialmente tossici, della loro possibile lisciviazione e del conseguente raggiungimento delle acque sotterranee, si fa più concreto.

Per quanto riguarda i punti con più alta CSC ( $> 20 \text{ cmol}_{(c)} \text{kg}^{-1}$ ) essi sono situati nell'appennino pavese, nella provincia di Mantova e in quella di Varese.

Qualche campione nel Mantovano ha presentato valori di CSC superiori a 30  $\text{cmol}_{(c)} \text{kg}^{-1}$ . Considerando anche i valori di pH trovati, superiori a 7.5, la saturazione basica è prossima al 100% e l'alta CSC diventa un difetto. La condizione ottimale dal punto di vista della fertilità è rappresentata da un'alta CSC e dalla contemporanea presenza di valori di pH compresi tra il 6.0 e il 7.5. Tale situazione è perlopiù presente nella fascia centrale della regione.

I giudizi attribuiti alla sostanza organica non considerano unicamente la sua percentuale, ma la rapportano anche alla percentuale di argilla presente. In linea generale si può affermare che i punti dove la sostanza organica sembra essere decisamente scarsa od insufficiente sono inferiori a quelli dove la sua presenza è soddisfacente. I terreni con più alta dotazione si trovano soprattutto nella parte settentrionale, mentre la carenza maggiore sembra riguardare le province di Cremona e Pavia (**Figura 1.2 d)**). Nell'humus propriamente detto il rapporto C/N oscilla fra 9 e 10, perciò valori prossimi a 10 indicano un buon stato di umificazione della sostanza organica. Un valore basso ( $< 5$ ) è indice di una mineralizzazione veloce della sostanza organica, probabilmente dovuta al tasso di concimazione azotata, mentre valori alti (20-40) sono indice di un basso tenore in sostanza organica, oppure di un eccessivo tenore in sostanza organica indecomposta a causa di un'umificazione stentata per carenza di azoto. In entrambi i casi (rapporto basso o alto) il terreno va ritenuto poco fertile perché la dotazione in elementi nutritivi è modesta a causa dell'immobilizzazione organica o del dilavamento degli elementi nutritivi. La nostra scala di giudizio considera bassi i valori inferiori a 9, medi quelli compresi tra 9 e 11, ed elevati se superiori a 11 (**Figura 1.2 e)**).



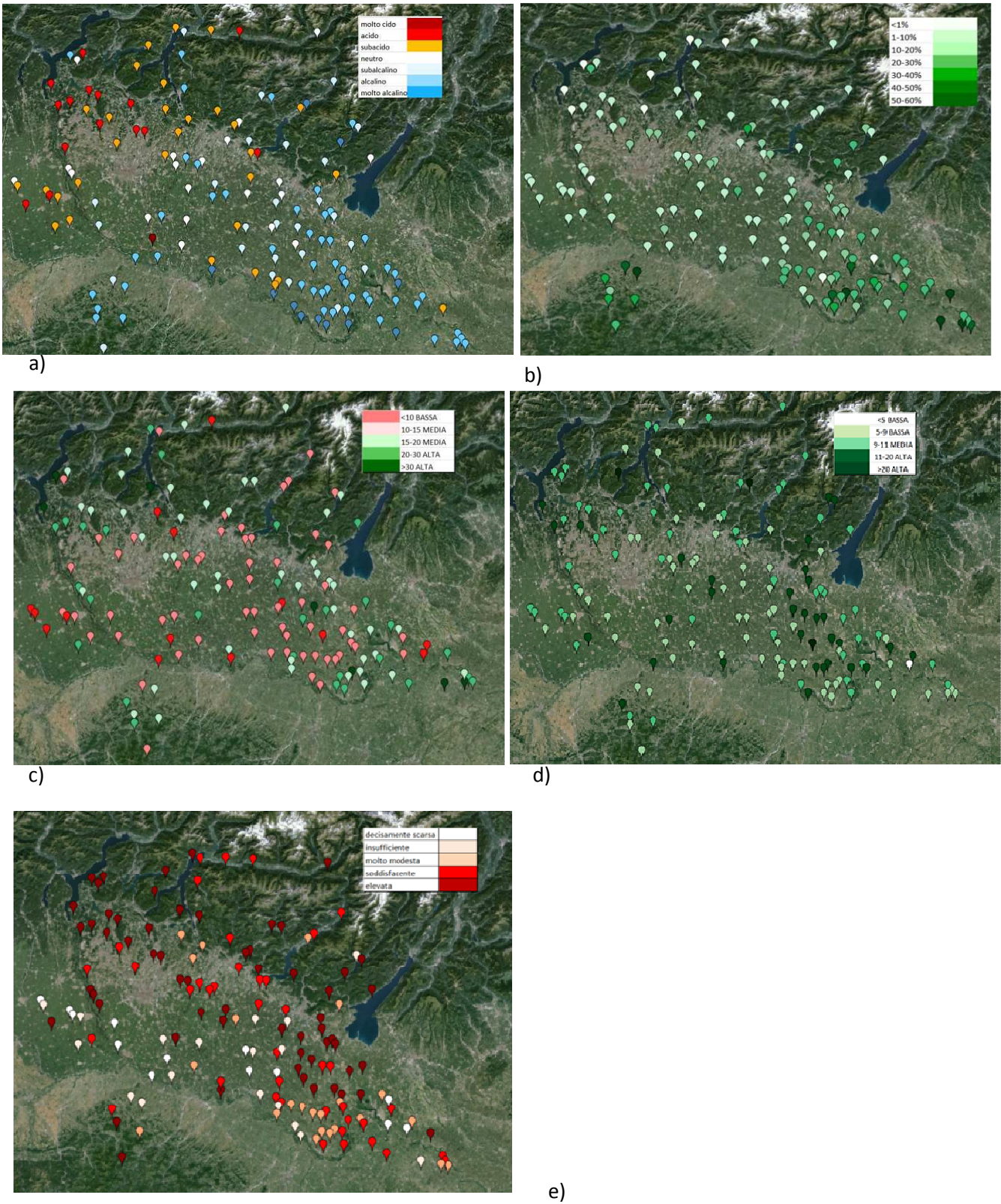


Figura 1.2. a) mappa dei valori di pH; b) composizione percentuale in argilla; c) capacità di scambio cationico; d) rapporto C/N e) sostanza organica

La *Tabella 1.2* riporta la statistica descrittiva dei risultati ottenuti per le 7 diverse categorie nelle quali i 156 campioni sembrano ricadere; la stragrande maggioranza ricade però in sole 3 categorie: Luvisol, Cambisol e Calcisol. Quasi tutta l'Italia fa parte della categoria Cambisol, ad eccezione di piccole parti nel centro-sud e nelle isole maggiori ricadenti nella categoria Vertisol, la zona estuarina del Po che fa parte dei Fluvisol (così come qualche punto nel mantovano e nel cremonese), e della Pianura Padana centro-occidentale che costituisce la categoria dei Luvisol (**Figura 1.1**).

La categoria Cambisol fa riferimento a suoli definiti giovani, che hanno subito un ringiovanimento dei materiali costituenti (il nome è relativo a tale caratteristica). Questi suoli sono molto produttivi dal punto di vista agronomico, ed in Lombardia li ritroviamo nella provincia di Mantova e Cremona, in quella di Pavia, ed al nord a ridosso della zona dei laghi e delle Prealpi.

I Calcisols presentano un significativo accumulo di carbonato di calcio, e generalmente si trovano in zone asciutte. Il nome indica la ricchezza in calcare e in limo di tali terreni. In Lombardia troviamo alcuni punti appartenenti a questa categoria, localizzati tra la provincia di Mantova e quella di Brescia.

L'altra grande categoria riscontrata è quella dei Luvisol. Questi suoli presentano una parte superficiale povera in argilla. In Lombardia essi occupano la fascia centro-occidentale.

Cinque dei 156 punti di terreno campionato ricadono nella categoria dei Leptosols, e sono tutti stanziati in zone montuose (Sondrio, Bergamo e appennino pavese). Questo tipo di suolo ha origine da materiale ghiaioso e ricco di calcare proveniente dall'erosione dei rilievi adiacenti. Dato lo sviluppo pedogenetico limitato, questi suoli non possiedono una grande struttura.

Sei punti del mantovano e cremonese, data la vicinanza al fiume Po, rientrano nella categoria Fluvisols, che raccoglie terreni giovani situati in depositi alluvionali. Essi presentano una buona fertilità. L'ultima categoria presente, in soli tre punti, è quella dei Podzols, suoli acidi con buon accumulo di sostanza organica, alluminio e ferro. I punti in questione si trovano in provincia di Como e nel nord di quella di Brescia. Al fine di operare una corretta analisi statistica occorre considerare quelle categorie con almeno un set di dati composto da una decina di campioni. Dopo di che bisogna stabilire se i dati a disposizione originano una distribuzione normale; altrimenti vengono trasformati in logaritmici. La normalità delle nostre distribuzioni è stata definita attraverso il test Kolmogorov-Smirnov.

Una volta raggiunta la normalità e lognormalità, si individuano gli outlier e si escludono dal calcolo del 95° percentile, che ci permette di capire quale sia il livello al di sotto del quale ricade il 95% dei dati.

*Tabella 1.2. Valori riscontrati per ogni elemento indagato divisi per tipologia di suolo (\* valori superiori ai limiti previsti dal D.Lgs 152/06)*

(mg kg <sup>-1</sup> )	Be	V	Co	As	Se	Cd	Sb	Tl	Pb	Cr	Cu	Ni	Zn	Hg	Sn	
95° percentile																
Cambisol nord	1,82	60	15,9	30*	1,43	1,00	1,78	0,52	95	54	53	48	146		3,2*	
Cambisol sud	1,57	60	22*	18	1,64	0,37	0,78	0,34	31	162*	133*	160*	128		1,48*	
Luvisol	1,39	48	12,3	23*	1,45	0,69	1,79	0,40	73	56	46	27	131		3,0*	
Calcisol	1,59	64	12,9	13,4	1,46	0,40	1,00	0,38	48	40	41	34	147		1,33*	
Tutta la Regione	1,61	65	21*	21*	1,54	0,47	1,44	0,42	60	70	66	52	145	0,19	2,4*	
Limite 152/06 A	2	90	20	20	3	2	10	1	100	150	120	120	150	1	1	
Limite 152/06 B	10	250	250	50	15	15	30	10	1000	800	600	500	1500	5	350	
N° superamenti																
Regione (156 tot)	A	1	0	17	23	2	1	0	2	3	6	7	14	12	0	89
	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Gli elementi che hanno più spesso superato i limiti di legge sono il cobalto, il nichel, il piombo e l'arsenico. Ad eccezione di un singolo caso relativo proprio a quest'ultimo elemento, i superamenti riguardavano il limite più restrittivo, il tabellare A del D.Lgs. 152/2006. Anche lo stagno è praticamente sempre al di sopra di tale livello; questo potrebbe essere dovuto ad un errore nella formulazione del limite stesso all'interno della norma legislativa.

Il superamento del limite tabellare B è probabilmente sintomo di una contaminazione antropica

La *Tabella 1.3* riporta invece i risultati ottenuti per gli inquinanti organici indagati. Il 95° percentile così individuato e i limiti tabellari imposti dal D.Lgs. 152/2006 ci hanno consentito in un secondo momento di costruire le classi di giudizio che abbiamo utilizzato per valutare dal punto di vista chimico, fisico e biologico le aree selezionate nella seconda fase. Per quanto riguarda i ritardanti di fiamma bromurati (BFR) non è previsto un limite di concentrazione all'interno della matrice suolo. Si tratta di miscele artificiali che vengono aggiunte a diversi tipi di prodotti (plastiche, articoli tessili, apparecchiature elettriche ed elettroniche) per ridurne l'infiammabilità. Esistono cinque classi di BFR. Sono stati indagati sono i PBDE: eteri bifenili polibromurati [6].

Le classi di valutazione individuate per i ritardanti di fiamma prendono in considerazione i valori del 25°, 50°, 75° e 95° percentile.

La categoria dei agrofarmaci clorurati (di cui fa parte il DDT) è stata l'unica a presentare degli sforamenti al limite contenuto nella tabella A del D.Lgs. 152/06. I punti in questione sono tre e mostravano concentrazioni pari a 48 ng g<sup>-1</sup>, 28 ng g<sup>-1</sup> e 730 ng g<sup>-1</sup>. Tali valori sono stati esclusi dall'elaborazione statistica dei dati, essendo outlier.

*Tabella 1.3. Valori ottenuti per le cinque classi di composti indagati (\*D.Lgs. 152/06)*

	diossine (ng I-TEQ kg <sup>-1</sup> )	PCB (ng g <sup>-1</sup> )	DL-PCB (ng WHO <sub>05</sub> -TEQ kg <sup>-1</sup> )	DDT (ng g <sup>-1</sup> )	BFR (ng g <sup>-1</sup> )
<b>min</b>	0.37	0.73	0.09	0.14	0.11
<b>25°percentile</b>	0.67	1.69	0.17	0.32	0.3
<b>media</b>	1.05	3.7	0.31	0.6	0.61
<b>mediana</b>	0.94	2.8	0.25	0.55	0.58
<b>75°percentile</b>	1.32	4.6	0.33	0.89	1.02
<b>95°percentile</b>	2.4	8.9	0.61	3.9	3.6
<b>max</b>	2.88	18.8	1.18	6.5	6.3
<b>A*</b>	10	60	10	10	60
<b>B*</b>	100	5000	100	2000	5000

*Tabella 1.4. Valori ottenuti per le nove attività enzimatiche analizzate (da sinistra: fosfomonoesterasi acida, fosfodiesterasi, pirofosfato-fosfodiesterasi, leucina aminopeptidasi, arisulfatasi, chitinasi, betaglucosidasi, acetato esterasi, fosfomonoesterasi alcalina)*

	acP	bisP	piroP	leu	aryS	chit	b-gluc	ester	alkP
<b>I quartile</b>	1225	568	202	421	0.004	106	79	22.729	2882
<b>mediana</b>	2354	1132	353	767	31	199	168	48.192	5614
<b>III quartile</b>	4089	1647	528	1359	176	342	293	85.531	7926
<b>95° percentile</b>	5876	3635	1162	1905	484	514	420	174.612	12.019

Anche per le attività enzimatiche abbiamo sfruttato i risultati ottenuti in questa prima fase per costruire le classi di valutazione applicate alle aree indagate nella seconda fase del progetto.

## 1.4 La determinazione della concentrazione di $^{60}\text{Co}$ , $^{134}\text{Cs}$ , $^{137}\text{Cs}$ e $^{40}\text{K}$ nei suoli agricoli Lombardi

Questo lavoro è parte del più ampio progetto di monitoraggio descritto fino ad ora. Tale approfondimento ha riguardato sia la fase generale dedicata a tutta la regione Lombardia, che quella circoscritta alle sette aree prescelte. Lo scopo era determinare la radioattività del suolo attraverso la misura del contenuto di  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  e  $^{40}\text{K}$ , mediante spettrometria gamma. I primi tre elementi derivano da contaminazione accidentale od intenzionale, mentre il  $^{40}\text{K}$  è ubiquitario in natura.

I due isotopi del cesio (Cs) derivano dalla fissione nucleare, e quindi sia da incidenti quali quello di Chernobyl, che da test nucleari svolti in passato. La differenza fra i due risiede nel tempo di dimezzamento, ovvero quel periodo necessario a far sì che la concentrazione di partenza si dimezzi. Il  $^{137}\text{Cs}$  impiega circa 30 anni a dimezzarsi, mentre il  $^{134}\text{Cs}$  circa 4 anni. Per questo motivo è normale che il primo sia ancora presente ma a concentrazioni pressoché dimezzate rispetto a quelle ricadute in seguito all'esplosione della centrale di Chernobyl. Tale presenza dipende dalla consistenza delle ricadute atmosferiche avvenute immediatamente dopo l'incidente, a causa della posizione della regione Lombardia (**Figura 3**). Il  $^{134}\text{Cs}$  proveniente dal disastro nucleare ucraino invece non dovrebbe più essere presente nei nostri suoli, e se così non fosse, la sua presenza sarebbe verosimilmente dovuta ad incidenti recenti in aree sufficientemente vicine da consentirne la deposizione atmosferica.

Il Cs radioattivo nei suoli tende a migrare nel corso del tempo. Ad oggi lo si ritrova prevalentemente nei primi 10 cm, specialmente nella porzione che va da 5 cm a 10 cm. Campionando terreni provenienti dai boschi è possibile verificare una maggiore concentrazione rispetto ai suoli destinati all'agricoltura, nei quali le lavorazioni come l'aratura, portano un'omogeneizzazione e una diluizione del  $^{137}\text{Cs}$ . I suoli boschivi, invece, rimangono inalterati e relativamente meno esposti alle precipitazioni atmosferiche. Questo porta a far sì che la maggior presenza di tale elemento negli strati superficiali si traduca in un contatto con organismi viventi quali animali selvatici che possono poi venire consumati dall'uomo. La cronaca recente riporta il caso di cinghiali contaminati da Cs radioattivo, ma ne esistono altri che riguardano l'accumulo nei funghi e nei vegetali dell'est europeo, dall'erba dei pascoli consumata dagli allevamenti bovini, al pellet derivato da alberi delle stesse zone [8,9,10,11,12,13].

Un'altra questione che sta emergendo attualmente è la migrazione laterale del Cs, dovuta all'erosione ed al trasporto a carico dell'acqua, che origina i cosiddetti "terreni arricchiti" di  $^{137}\text{Cs}$ .

Le figure 4 e 5 illustrano l'attività del  $^{137}\text{Cs}$  in tutta la regione Lombardia e le attività medie riferite ad ogni provincia.



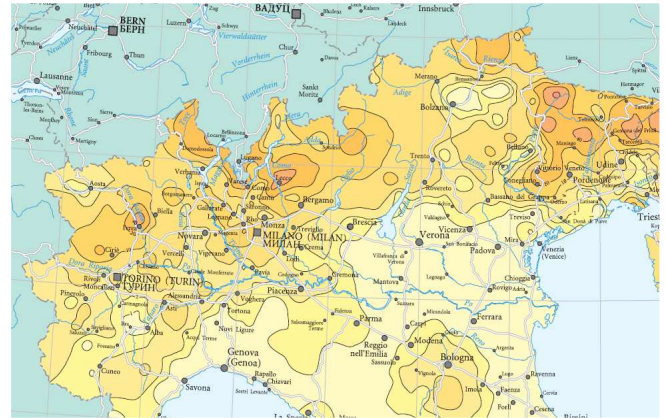
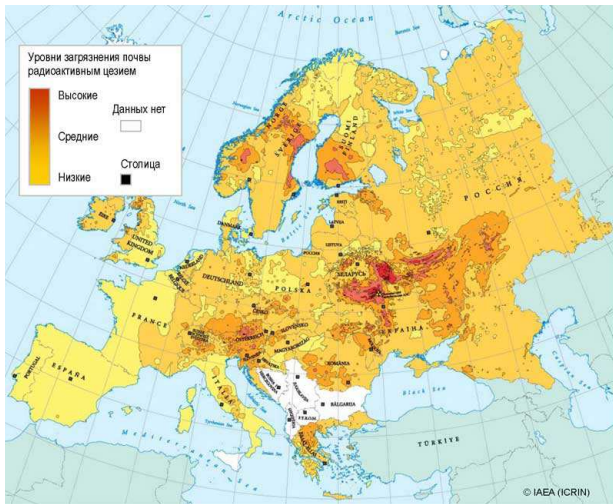


Figura 3. Da Atlante Europeo della contaminazione di Chernobyl: distribuzione di  $^{137}\text{Cs}$  in Europa ed in Italia settentrionale all'epoca della ricaduta.

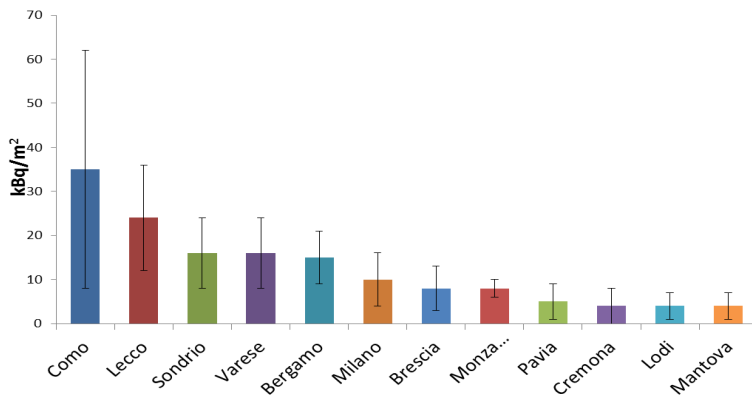


Figura 4. Istogramma dell'attività media relativa deviazione standard per il  $^{137}\text{Cs}$  rilevata nelle province lombarde.

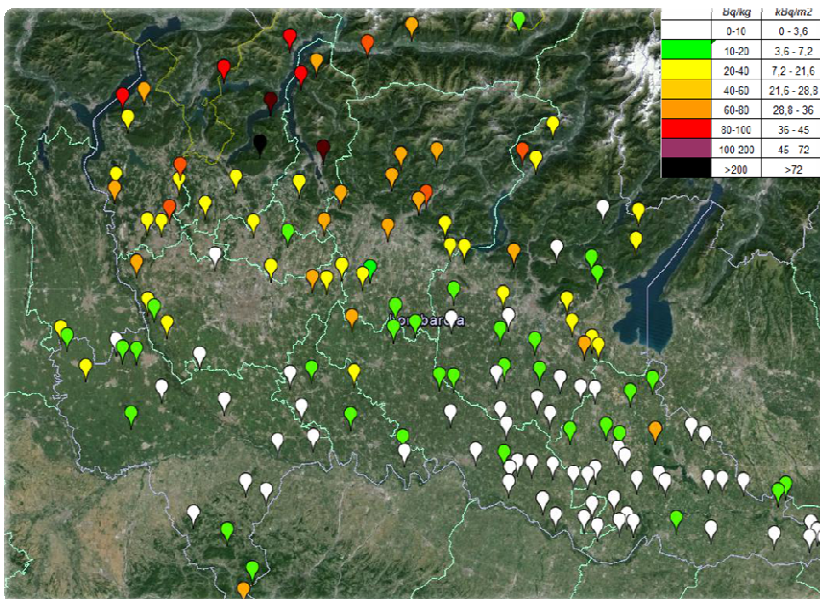


Figura 5. Mappa tematica delle attività del  $^{137}\text{Cs}$  in regione Lombardia relativa all'anno 2011.



Il  $^{60}\text{Co}$  invece è usato in ambito ospedaliero e può essere considerato un “tracciante” della presenza di questo tipo di rifiuti. Trovare tale elemento nei campioni di suolo agricolo – ma anche in suoli destinati ad altri usi – indica un abbandono doloso di rifiuti speciali per i quali è previsto un preciso iter di smaltimento.

Il  $^{40}\text{K}$  è un radionuclide gamma-emittente naturale, che possiede dei tempi di dimezzamento pari a  $1,277 \times 10^9$  anni. Esso è ubiquitario sulla terra e la sua concentrazione dipende in parte dalla fertilizzazione potassica, ma soprattutto dal materiale parentale. La Figura 6 mostra la correlazione tra il radionuclide e il potassio totale nei suoli lombardi indagati.

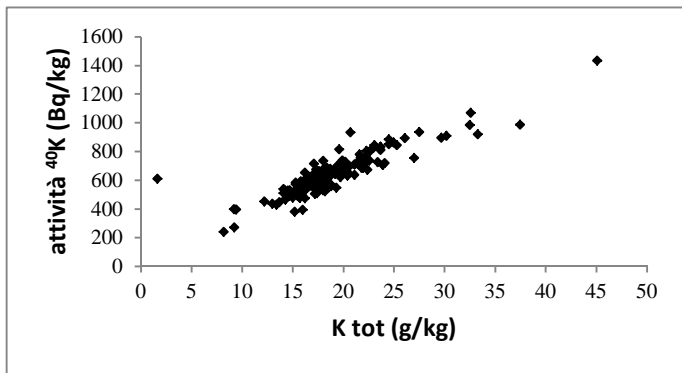


Figura 6. Grafico della correlazione fra attività del  $^{40}\text{K}$  e la concentrazione totale in regione lombardia.

Una parte dei 156 campioni della prima fase è stata analizzata contemporaneamente dal CCR di Ispra, ed i dati che hanno ottenuto erano sovrapponibili ai nostri.

# $^{60}\text{Co}$ , $^{134}\text{Cs}$ , $^{137}\text{Cs}$ and $^{40}\text{K}$ in agricultural soils of the Lombardia region, northern Italy

Laura Guidotti<sup>a</sup>, Franca Carini<sup>a\*</sup>, Riccardo Rossi<sup>b</sup>, Marina Gatti<sup>a</sup>, Roberto M Cenci<sup>c</sup>, Gian Maria Beone<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale, Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza, Italy

<sup>b</sup> AEIFORIA Srl Spin-off of Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy, [riccardo.rossi@aeiforia.eu](mailto:riccardo.rossi@aeiforia.eu).

<sup>c</sup> BIO-BIO, Via Collina 13, 21023 Besozzo, Varese, Italy, [roberto.cenci50@gmail.com](mailto:roberto.cenci50@gmail.com)

\*Corresponding Author: Tel: 39 3337553638

E-mail address: [franca.carini@unicatt.it](mailto:franca.carini@unicatt.it)

## Highlights

- A monitoring campaign of agricultural soils was carried out in Lombardia, Italy.
- 156 topsoils were sampled according to the European standard procedure LUCAS.
- $^{137}\text{Cs}$  ranged 0.4-86.8 kBq m<sup>-2</sup>, the highest activities were on lawn and pasture.
- $^{40}\text{K}$  ranged 242-1434 Bq kg<sup>-1</sup>.  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{134}\text{Cs}$  were lower than minimum detectable activity.
- Results provide a baseline useful to assess future effects due to anthropic factors.

## Abstract

This work is part of a wider monitoring project of the agricultural soils in Lombardia, which aims to build a database of topsoil properties and the potentially toxic elements, organic pollutants and gamma emitting radionuclides that the topsoils contain. A total of 156 agricultural soils were sampled according to the LUCAS (Land Use/Cover Area frame statistical Survey) standard procedure. The aim was to provide a baseline to document the conditions present at the time of sampling. The results of the project concerning soil radioactivity are presented here. The aim was to assess the content of  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{40}\text{K}$  by measuring soil samples with gamma spectrometry. The  $^{60}\text{Co}$  and  $^{134}\text{Cs}$  activity is < 0.5 and 0.7 Bq kg<sup>-1</sup> respectively.  $^{137}\text{Cs}$  activity ranges from 0.4 to 86.8 kBq m<sup>-2</sup> and shows an arithmetic mean of  $9.0 \pm 10.4$  and a geometric mean of  $5.8 \pm 2.5$  kBq m<sup>-2</sup>. The lowest activity is in the plain, whereas the highest is in the North in an area around the Como Lake on soils kept as lawn or pasture. The  $^{40}\text{K}$  values range from 242 to 1434 Bq kg<sup>-1</sup> and show an arithmetic mean of  $640 \pm 150.3$  and a geometric mean of  $623.3 \pm 1.3$  Bq kg<sup>-1</sup>. The  $^{40}\text{K}$  values show a wide spatial dispersion of high and low activity in both the mountainous and plain regions. This is the first survey in Lombardia that is based on the LUCAS standard sampling. The results from this monitoring campaign provide the zero point, which will be useful for assessing future effects due to external factors such as human activities.

**Keywords:**  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{40}\text{K}$ , agricultural soil, monitoring, LUCAS sampling,  $^{137}\text{Cs}$  enriched soils

## 1. Introduction

There is an increasing demand for soil data and information from policymakers to assess the state of soils at both the national and international levels. Agricultural soils are of special concern because they pose a direct threat to human and environmental health. To meet this demand, “Regione Lombardia” gave a mandate to the Università Cattolica del Sacro Cuore (UCSC) in Piacenza and to the Joint Research Centre - Institute for Environment and Sustainability (JRC-IES) in Ispra in 2011 to assess the quality of agricultural soils in the Lombardia region through a three-year environmental monitoring program: the “Soil Mapping” project.

Agricultural topsoils in Lombardia have been sampled and analyzed to determine their main properties and for potential toxic elements, organic pollutants and gamma-emitting radionuclides. These analyses were complemented by biological analyses in the second phase of the project. The survey represents the first effort in Lombardia to build a database of topsoil properties based on standard sampling and analytical procedures (JRC, 2013).

This work presents the part of the project that concerns the radioactivity of the soils. The main aim of this survey was to ascertain any accidental or intentional pollution by gamma-emitting  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{134}\text{Cs}$  and  $^{137}\text{Cs}$  radionuclides. Measures of the natural radionuclide  $^{40}\text{K}$  were also included, given the ease of detecting  $^{40}\text{K}$  with gamma spectrometry.

Various surveys of anthropogenic radionuclides in the soils of Lombardia have been carried out by the Regional Environment Protection Agency (ARPA) in the years since the Chernobyl accident in 1986 to check for compliance with European and Italian rules (ARPA Lombardia, 2003; 2006). However, this is the first survey based on LUCAS (Land Use/Cover Area frame statistical Survey) standard sampling (EUROSTAT, 2000) and provides a baseline to document the conditions present in 2011 and to scientifically assess future effects due to external factors such as human activities.

## 2. Materials and methods

### 2.1 The survey location

Lombardia region covers an area of 23,834 km<sup>2</sup> in North Italy (Figure 1). It borders with Swiss to the North and extends southwards to the Po river, is limited by Lake Maggiore and Ticino river to the west and by Lake Garda and Mincio river to the east. It is characterized by a succession of different geological and structural areas which are from North to South: Alps, Southern Alps, Po Plain and northern Apennines. 40.5% of the territory is mountainous, mainly located in the northern area, 12.4% is hilly and 47.1% is flat located in the south. A minor mountainous area lies south of the Po in the Apennines range. The region is characterized by the presence of lakes of glacial origin and is crossed by several water courses, among which the Po river, which gives its name to the Po Plain.



Figure 1. Geographical position of the Lombardia region in Europe

## 2.2 The survey design

The target population of this project was represented by the agricultural soils distributed over the whole area, including both croplands and grasslands. In the context of the LUCAS program croplands include: cereals, root crops, non-permanent industrial crops, dry pulses, vegetables and flowers, fodder crops, permanent crops, while grasslands include: pastures under sparse tree or shrub cover, grassland without tree/shrub cover, spontaneously re-vegetated surfaces. The soils to be examined were selected from the pre-existing network of LUCAS geo-referenced points (EUROSTAT, 2000) by the JRC-IES in the framework of a wider project which covered the whole Europe. A multi-stage stratified random sampling scheme based on land use and terrain information was adopted (McKenzie et al., 2008, cited by Carré et al., 2013). Details of the methodology for the selection of soil sampling sites are given in the JRC Technical Report (2013). This approach allowed the selection of sampling locations proportional to the agricultural land use, taking into account that LUCAS survey does not cover areas above 1000 m in elevation.

The sampling points resulting from the random selection were reduced to 156 by expert judgment, in a perspective of efficiency to optimize time and costs (ICRU, 2006). The final mean density of the sampling points was around one sample per 153 km<sup>2</sup>.

## 2.3 The sampling points

The sampling team was provided with a triplet of points suitable for sampling, whose geodetic datum was the European Terrestrial Reference System 1989 (ETRS89) (Annoni et al., 2001, cited by EUROSTAT, 2005). In order to make either the tracking with common GPS devices and the exchange of information much easier, the sampling team decided to refer to the World Geodetic System Datum 1984 (WGS-84) by using the Transdat software (Killet Software Ing.-GbR). A triplet is a group of three LUCAS points that have common properties such as slope, aspect and land cover. The triplet concept was established by LUCAS project to hold alternative locations for the surveyor to collect a soil sample should the initial point designated not be physically accessible (Carré et al., 2013). One of the three references chosen by the surveyors became the theoretical point of sampling. In the case of inability to sample at that pre-determined location, the sampling team selected a nearby location, keeping in mind that the target soil had to be an agricultural land or a land interested by agricultural activity in the past, even in problematic areas as hills and mountains. The actual sampling point was tracked and reported, along with sampling details and a description of the area. The sampling campaign was carried out between September 2011 and half June 2012.

## 2.4 The sampling units

The sampling units were arbitrarily sized to have a mass to be easily processed and measured. Each sampling location was considered as being overlaid by a 20 x 20 m grid, subdivided in 25 cells of 4 x 4 m. An example of one of the possible randomizations is reported in Figure 2.

● 1	2	● 3	4	● 5
● 6	● 7	8	● 9	10
11	● 12	● 13	14	● 15
● 16	17	● 18	● 19	20
21	● 22	● 23	24	● 25

Figure 2. Conceptual diagram of the 20x20 m grid subdivided in 25 cells, from which 15 (shown by spots) were selected randomly for sampling

Fifteen soil cores of 5.3 cm<sup>2</sup> x 30 cm were sampled in 15 cells selected by a random process. The 30 cm depth was chosen to cover the soil portion interested by the agricultural practices. The 15 cores were mixed and homogenized in field to meet a composite sample before analysis. Each sampling unit can be seen as cluster of fifteen points, corresponding to an actual area of 8.0 x 10<sup>-3</sup> m<sup>2</sup> and a volume of 2.4 x 10<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>. Stones, vegetation and other coarse material were removed in the field during the sampling procedures (Cenci, 2008).

Once in the laboratory the soils were oven dried at 40 °C until constant weight, disaggregated to pass through a 2 mm sieve, homogenized and then divided into two subsamples to be also sent to chemical analyses.

## 2.5 The analytical procedure

1.2 kg of the sieved soil was introduced in 1L Marinelli beaker for analysis. <sup>60</sup>Co, <sup>134</sup>Cs, <sup>137</sup>Cs and <sup>40</sup>K were determined by direct gamma-spectrometry using a coaxial HPGe detector with relative efficiency (at 1.33 MeV of <sup>60</sup>Co) of 38% and a resolution (FWHM at 1.33 MeV of <sup>60</sup>Co) of 1.76 keV. The peak -to- Compton ratio calculated for the 1.33 MeV photopeak of <sup>60</sup>Co is 70.8. The software used by the spectrometry chain is the Genie 2000 of the Canberra Nuclear.

The efficiency calibration was experimentally determined for 1L measuring geometry through certified source (density of 1.0 g cm<sup>-3</sup>) containing gamma emitters of energy from 88 to 1836 keV. Each sample was measured for 60,000 seconds. The background was determined using both a Marinelli filled with 1L of distilled water and an empty one under identical measurement conditions.

The radionuclide concentration was expressed as Bq kg<sup>-1</sup> dry soil or Bq m<sup>-2</sup>.

Bq kg<sup>-1</sup> values were converted to Bq m<sup>-2</sup> by the area and volume of the sampled unit and in the hypothesis that the average soil bulk density is  $d = 1.2 \text{ g cm}^{-3}$ :

$$\text{Bq m}^{-2} = \text{Bq kg}^{-1} \times 360.0 \text{ kg m}^{-2}$$

All the measured activities were decay corrected to the reference date 21<sup>st</sup> September 2011, the date of starting of gamma analyses.

## 2.6 The correction factors

Despite the care taken in sample collection, some soil sample did not reach the volume of 1L (mass of 1.2 kg) corresponding to the nominal height ( $h_0$ ) of calibration. To stick to the geometry of 1L, correction factors ( $C_h$ ) were empirically derived for the peaks at 661.7 keV of <sup>137</sup>Cs and 1460.8 keV of <sup>40</sup>K.

$C_h$  is usually expressed as the ratio of spectrometer efficiency for the nominal sample height  $\varepsilon(h_0)$  to the one obtained for the actual sample height  $\varepsilon(h)$  (Jodłowski, 2007):

$$C_h = \frac{\varepsilon(h_0)}{\varepsilon(h)}$$

This works on the basis that this ratio is fairly constant above 400 keV (Debertin and Helmer, 1988). The efficiencies for the various sample heights  $\varepsilon(h)$  were derived from the experimental efficiency calibration through a semi-empirical model as follows. In addition to the nominal sample, seven measurement geometries ( $h_i$ ) were considered, where  $i$  corresponds to the soil mass of 0.50, 0.85, 0.90, 1.00, 1.05, 1.10, 1.15 kg. Gamma ray spectrometry measurements were performed for each of the geometries. Sample heights were the same as in spectrometry measurements. Results were expressed as  $\text{Bq kg}^{-1} (h_0)$  for the nominal sample and  $\text{Bq kg}^{-1} (h_i)$  for the actual samples. Their values prove that the measured activity varies linearly with the sample height, in the range of mass and for the activity under study, showing a determination coefficient  $r^2 = 0.994$  (Figure 3).

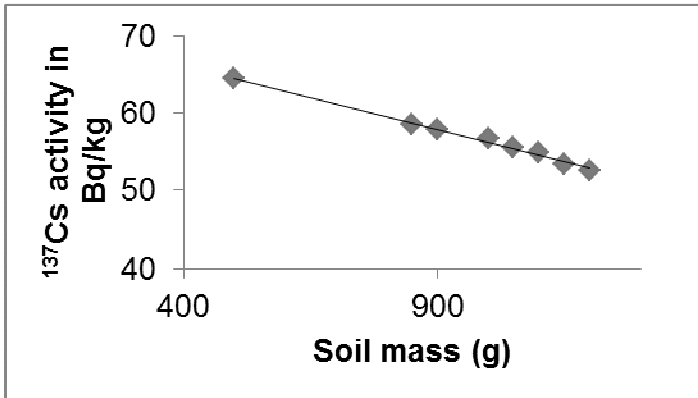


Figure 3. <sup>137</sup>Cs activity in soil vs the soil mass

Correction factors were then calculated as:

$$C_h = \frac{\text{Bq kg}^{-1} (h_0)}{\text{Bq kg}^{-1} (h_i)}$$

Where the sample material was less than 1.2 kg, to account for the difference in the height of the sample, the results from the gamma spectrometry were corrected as follows:

$$\text{Bq kg}^{-1} (h_0) = C_h * \text{Bq kg}^{-1} (h_i)$$

### 3. Results and discussion

The object of this monitoring work was to ascertain the presence and the concentration of <sup>60</sup>Co, <sup>134</sup>Cs, <sup>137</sup>Cs and <sup>40</sup>K radionuclides in the agricultural soils of Lombardia, thereby providing baseline documentation of the conditions in 2011. The activity measured in soil samples expresses the average values of the radionuclides in the 0-30 cm layer, regardless of their distribution along the soil profile. All contamination values are associated with geographical points, each of which represents a 20 x 20 m<sup>2</sup> area.

#### 3.1 <sup>60</sup>Co and <sup>134</sup>Cs

No activity of <sup>60</sup>Co and <sup>134</sup>Cs was found in the analyzed samples. The soil activity was always lower than the minimum detectable activity (MDA) for the method: 0.5 and 0.7 Bq kg<sup>-1</sup> for <sup>60</sup>Co and <sup>134</sup>Cs, respectively.

The absence of <sup>60</sup>Co proves that there was no uncontrolled disposal of artificial sources in the inventoried areas, which would have been followed by dispersion into the environment. The absence of <sup>134</sup>Cs, which was introduced into the environment by the Chernobyl accident in 1986, is explained by its relatively short half-life, 2.06 years, and by its low activity, estimated at 5 kBq m<sup>-2</sup> in 1986 in northern Italy.

#### 3.2 <sup>137</sup>Cs inventory

The concentration of <sup>137</sup>Cs in soils has been expressed as specific activity both in kBq m<sup>-2</sup> and in Bq kg<sup>-1</sup> dry soil. The position indexes for <sup>137</sup>Cs, expressed as kBq m<sup>-2</sup> and Bq kg<sup>-1</sup>, are reported in Table 1. The frequency distribution of the values is reported, along with a box-plot, in Figure 4 and is expressed as kBq m<sup>-2</sup>.

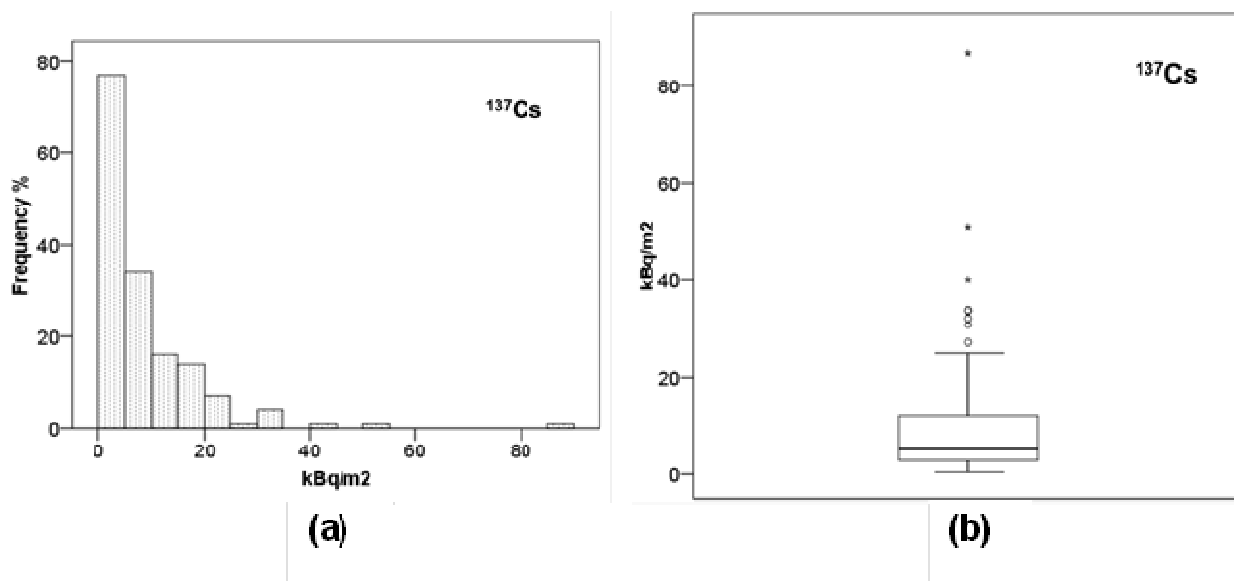


Figure 4. (a) Frequency distribution and (b) box-plot of  $^{137}\text{Cs}$  activity in soil samples, expressed as  $\text{kBq m}^{-2}$  in September 2011

$^{137}\text{Cs}$  is detectable in all of the analyzed samples. The values show a wide variability, ranging from a minimum of 0.4 to a maximum of 86.8  $\text{kBq m}^{-2}$ . The position indexes of the frequency distribution have been calculated: the arithmetic and geometric mean; standard deviations; mode; and the 25<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, 75<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles. They are reported in Table 1 and are expressed both as  $\text{kBq m}^{-2}$  and as  $\text{Bq kg}^{-1}$ .

Table 1. Position indexes for  $^{137}\text{Cs}$  activity, expressed both as  $\text{kBq m}^{-2}$  and as  $\text{Bq kg}^{-1}$  dry soil, for 156 soils in September 2011

Parameter	$\text{kBq m}^{-2}$	$\text{Bq kg}^{-1}$
Arithmetic mean	9.0	25.0
Standard deviation	10.4	29.0
Geometric mean	5.8	16.2
Geometric standard deviation	2.5	2.5
Minimum	0.4	1.1
Maximum	86.8	241.0
Mode	3.0	8.3
25 <sup>th</sup> percentile	2.9	8.0
50 <sup>th</sup> percentile/Median	5.1	14.3
75 <sup>th</sup> percentile	11.9	33.0
95 <sup>th</sup> percentile	27.7	77.0

The arithmetic mean (9.0  $\text{kBq m}^{-2}$ ) does not match the median (5.1  $\text{kBq m}^{-2}$ ) or the mode (3.0  $\text{kBq m}^{-2}$ ), indicating that this is a non-normal distribution. The curve must have a tail to the right because the median is lower than the mean. The analysis of the frequency distribution (Figure 4) shows a lognormal trend, as expected when the value of the median (5.1  $\text{kBq m}^{-2}$ ) is closer to the geometric (5.8  $\text{kBq m}^{-2}$ ) than to the arithmetic mean (9.0  $\text{kBq m}^{-2}$ ), as commented on by other researchers (Blagoeva and Zikovskiy, 1995).

This trend is confirmed by the Kolmogorov-Smirnov (K-S) test, which shows that the distribution significantly deviates from a normal one ( $p < 0.05$ ). The same K-S test performed on the log-transformed data,  $\log \text{kBq m}^{-2}$ , shows that the distribution does not significantly deviate from a normal distribution ( $p > 0.05$ ).

The most represented classes of soils are those with values lower than 10  $\text{kBq m}^{-2}$  (Figure 4). This is confirmed by a 75<sup>th</sup> percentile value of 12  $\text{kBq m}^{-2}$ . The values of the highest frequency class range from 2 to 4  $\text{kBq m}^{-2}$ , as confirmed by a mode of 3  $\text{kBq m}^{-2}$ . The median corresponds to 5  $\text{kBq m}^{-2}$ . The 95<sup>th</sup> percentile value of 28  $\text{kBq m}^{-2}$  identifies seven outliers, with the highest activity, at 30.8 to 86.8  $\text{kBq m}^{-2}$ .

Historically  $^{137}\text{Cs}$  in soils derives partly from the testing of nuclear weapons in the atmosphere from 1945 to 1980 and partly from the Chernobyl accident in 1986. The deposition density of  $^{137}\text{Cs}$  from nuclear weapons was estimated to be approximately 5.2  $\text{kBq m}^{-2}$  at 40° to 50° North latitude at the end of the 1970s, which decay corrected to 2.5  $\text{kBq m}^{-2}$  by September 2011 (UNSCEAR, 1982; 2000 Annex C). The mean  $^{137}\text{Cs}$  deposition density over northern Italy from Chernobyl was estimated to be 10  $\text{kBq m}^{-2}$  in 1986, which decay corrected to 5.6  $\text{kBq m}^{-2}$  by September 2011. From the above findings, the average value for  $^{137}\text{Cs}$  in soils of northern Italy can be mathematically estimated to be

approximately 8 kBq m<sup>-2</sup> at September 2011. The data on the averages obtained in this work are in good agreement with the historical data, showing an arithmetic mean of 9.0 ± 10.4 and a geometric mean of 5.8 ± 2.5 kBq m<sup>-2</sup> (Table 1).

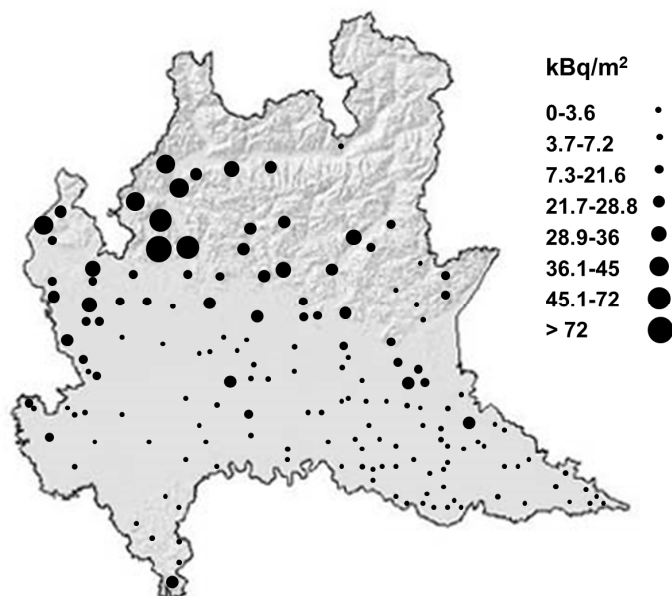


Figure 5. Surface contamination of Lombardia territory by <sup>137</sup>Cs, expressed as kBq m<sup>-2</sup>

The 156 geo-referenced points, accompanied by the <sup>137</sup>Cs activity density in kBq m<sup>-2</sup>, are reported on a map of the Lombardia region (Figure 5). The region can be divided into three longitudinal areas with the lowest concentrations of <sup>137</sup>Cs prevailing in the Po Plain in the South, lower than 7 kBq m<sup>-2</sup>, and the highest concentrations in the Alps and Southern Alps in the North, at 22 to 87 kBq m<sup>-2</sup>. It is known that <sup>137</sup>Cs from nuclear weapon tests was injected into the stratosphere and was deposited quite homogeneously with respect to latitude. In contrast, <sup>137</sup>Cs from Chernobyl was released into the troposphere, and its deposition exhibited very high spatial variability, concentrating in those geographical areas subject to abundant meteoric precipitations, particularly in the Alpine valleys (Bossey et al., 2001; Lettner et al., 2006).

The area in the North includes the seven soils with the highest <sup>137</sup>Cs activity: 30.8 - 86.8 kBq m<sup>-2</sup>, which are the outliers shown in Figure 4. The seven soils are located from the right side of Lake Maggiore to the western side of Lake Como in the province of Lecco at 200 to 600 meters above sea level. These soils are kept as lawn or pasture and are classified as grasslands in the CORINE LANDCOVER 2000 dataset (APAT, 2005). Their activity reflects the measurements reported after the Chernobyl accident of 23-56 kBq m<sup>-2</sup> in the area around Lecco and 11-23 kBq m<sup>-2</sup> in the areas of Como, Lugano and Varese (De Cort et al., 1998; ARPA Lombardia, 2003; 2006).

However the activity in the literature does not explain the highest activity density of 86.8 kBq m<sup>-2</sup>, which was measured in a sample in Como Province (Figures 4 and 5). The information registered by the operator describes an organic, humid soil in a foothill area. The chemical analyses confirm the high content of organic matter: 17.7 %. It is known from the literature that nutrient cycling and storage in organic soil horizons leads to a much longer persistence of radionuclides in semi-natural environments in comparison with cultivated agricultural land (Myttenaere et al., 1992, cited by Strebl and Tataruch, 2007). However, in this case, the activity was so high as to suggest soil affected by secondary transport processes, such as lateral migration, erosion and accumulation, which lead to a “<sup>137</sup>Cs enriched soil”. These processes have been described and studied by various authors, especially in the unprocessed mountainous soils (Pourcelot et al., 2003; IAEA, 2004; Agnesod et al., 2006; Schaub et al., 2010). This hypothesis needs to be confirmed by further sampling in the surrounding areas.

The activity of <sup>137</sup>Cs detected in the soils of the Lombardia region from 2011-2012 turns out to be a measure of the actual inventory, corresponding to the initial deposition minus the various ecological relocation processes that occurred between fallout and sampling, as commented on by Bossey and co-workers, who described contamination of Austrian soils with <sup>137</sup>Cs (2001).

This confirms the importance of environmental monitoring that documents the current conditions of soils. It would allow policymakers to explain events such as that occurred in early spring 2013 in Piemonte, a region bordering Lombardia, when the presence of radioactivity in wild boar was higher than permitted by international law, which raised concern among consumers.

### 3.3 $^{40}\text{K}$ spatial distribution

The concentration of  $^{40}\text{K}$  in soils has been expressed as specific activity in  $\text{Bq kg}^{-1}$  dry soil. The frequency distribution of the values is reported, along with a box-plot, in Figure 6.

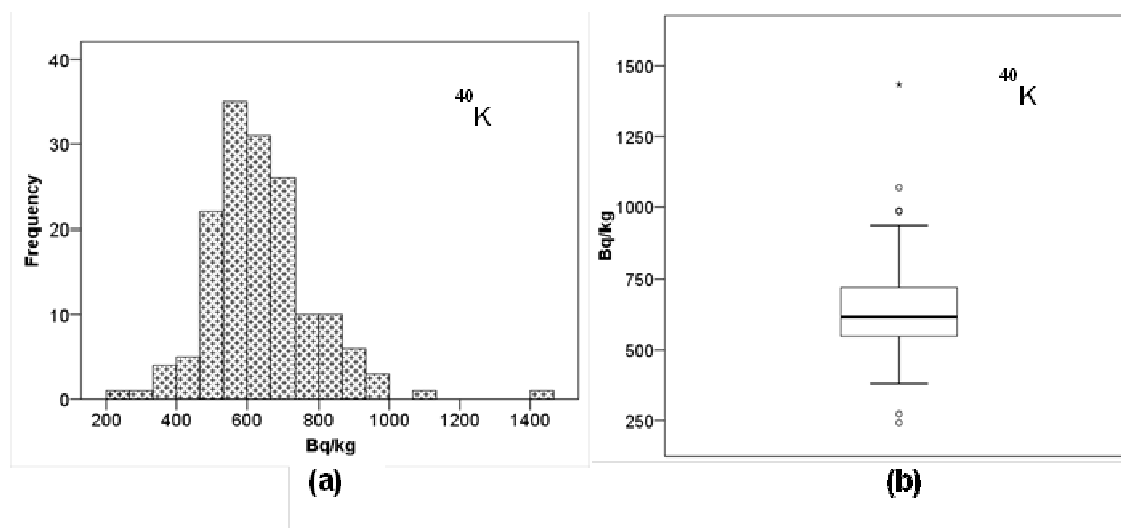


Figure 6. Frequency distribution (a) and box-plot (b) of  $^{40}\text{K}$  activity in soil samples, expressed as  $\text{Bq kg}^{-1}$  dry soil

The position indexes for  $^{40}\text{K}$ , expressed as  $\text{Bq kg}^{-1}$ , are reported in Table 2.

Table 2. Position indexes for  $^{40}\text{K}$  activity, expressed as  $\text{Bq kg}^{-1}$  dry soil, for 156 soils

Parameter	$\text{Bq kg}^{-1}$
Arithmetic mean	640.0
Standard deviation	150.3
Geometric mean	623.3
Geometric standard deviation	1.3
Minimum	241.8
Maximum	433.8
Mode	554.8
25 <sup>th</sup> percentile	547.9
50 <sup>th</sup> percentile/Median	616.5
75 <sup>th</sup> percentile	719.7
95 <sup>th</sup> percentile	898.6

The  $^{40}\text{K}$  values range from 242 to  $1434 \text{ Bq kg}^{-1}$  show an arithmetic mean of  $640 \text{ Bq kg}^{-1}$ , a standard deviation of  $150 \text{ Bq kg}^{-1}$ , a geometric mean of  $623.3 \text{ Bq kg}^{-1}$  and a geometric standard deviation of  $1.3 \text{ Bq kg}^{-1}$  (Table 2). The frequency distribution shows a short tail to the right, but the K-S test demonstrates that the distribution does not deviate significantly from either a normal or a lognormal distribution. This observation was also made by other authors about the frequency distribution of  $^{40}\text{K}$  concentrations in soils and plants (Bunzl et al., 2000).

The  $^{40}\text{K}$  represents 0.012% of naturally occurring K in the earth's crust, corresponding to approximately 1.8 ppm, while total K corresponds to 18,400 ppm (Crustal abundance or Clarke value: Fortescue, 1992, cited by De Capitani et al., 2007). The  $^{40}\text{K}$  concentration in soils can vary substantially with geographic location, depending on the composition of the parent rock and on soil genesis in different climatic conditions. According to UNSCEAR, the world concentration of  $^{40}\text{K}$  ranges from 66 to  $1150 \text{ Bq kg}^{-1}$ , with an average of 370 and a median of  $400 \text{ Bq kg}^{-1}$  (UNSCEAR, 2000, annex B). However, higher values of  $^{40}\text{K}$  in soils are reported, for example, in north-eastern Brazil, where activity ranges from 541 to  $3572 \text{ Bq kg}^{-1}$  and shows an arithmetic mean of 1827 and a geometric mean of  $1696 \text{ Bq kg}^{-1}$  (Dos Santos Junior et al., 2005).



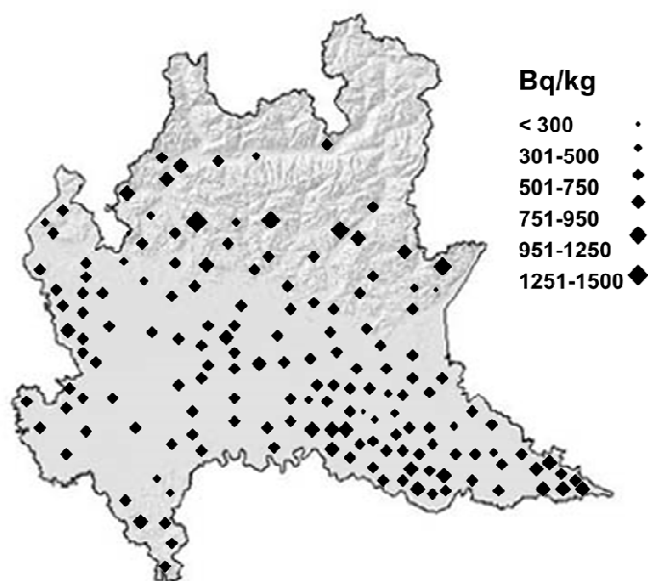


Figure 7. Surface concentration  $^{40}\text{K}$  in Lombardia territory, expressed as  $\text{Bq kg}^{-1}$  dry soil

The values of  $^{40}\text{K}$  activity in the 156 soil samples are reported on the Lombardia map, expressed as  $\text{Bq kg}^{-1}$  (Figure 7). A wide spatial dispersion of high and low activity can be seen both in the mountainous and plain regions. The three highest values, the outliers in Figure 6, are from the Prealps, in the provinces of Lecco, Bergamo and Brescia. High values are also recorded in other samples in the mountains and on the plain, such as  $884 \text{ Bq kg}^{-1}$  in the province of Cremona and  $862 \text{ Bq kg}^{-1}$  in Mantova, as well as  $933 \text{ Bq kg}^{-1}$  in the Oltrepo Pavese hills in the province of Pavia. The two lowest outliers of Figure 6 are  $242 \text{ Bq kg}^{-1}$  in the Po Plain and  $272 \text{ Bq kg}^{-1}$  in a mountainous area on the western shore of Garda Lake.

Most of the rocks that are widespread in the Alpine belt are high-K calc-alkaline granitoids, which are associated with higher levels of natural radioactivity (APAT, 2004). Some authors have measured natural radionuclides in the central sector of the southern alpine domain of Lombardia, not in the soils but in rock outcrops (De Capitani et al., 2007). They report values from  $431$  to  $1243 \text{ Bq kg}^{-1}$  on the eastern side of Como lake (Val Biandino) and from  $1295$  to  $1479 \text{ Bq kg}^{-1}$  in the mountainous region of Brescia province (Val Trompia) (De Capitani et al., 2007); these values agree with our data from northern Lombardia. Percentages of K ranging from  $0.08$ - $5.14\%$  are also reported in rocks in North Italy along the Alps-Appennines transition (Chiozzi et al., 2002). The percent K in the soils of this project, calculated by the  $0.012\%$  of  $^{40}\text{K}$  in the earth's crust, corresponds to  $0.163$ - $4.51\%$ , values that fall in the range measured by Chiozzi and co-workers (2002).

Although, in general, the spatial variation in natural radionuclide concentration reflects geochemical differences among the parent rocks, it is not possible from the previously mentioned findings to explain the variations in the concentration of  $^{40}\text{K}$  simply by the orographic location of the samples. Another variable that affects the  $^{40}\text{K}$  concentration in soils is the application of potassium fertilizers on most of the agricultural soils, the target population of this project.

Various authors also refer to a correlation between the  $^{40}\text{K}$  and clay content of the soil, given their selectivity and fixation for the alkali cations (de Jong et al., 1994). The results of this project confirm a positive correlation with clay content and a negative correlation with sand content; however, neither is significant.

#### 4. Conclusions

The increasing demand for agricultural soil data and information on a highly industrialized area, such as Lombardia, has been met through a project that monitors potentially toxic elements, organic pollutants and gamma-emitting radionuclides. The results on the monitoring of  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{40}\text{K}$  are discussed in this work. This is the first survey in Lombardia based on LUCAS standard sampling.

From the gamma analyses of 156 geo-referenced agricultural soils in Lombardia, we can conclude the following:

- The soils under study are free from  $^{60}\text{Co}$  and  $^{134}\text{Cs}$  pollution.
- The  $^{137}\text{Cs}$  is ubiquitous, but it shows highly variable levels of activity. The highest activity is in the mountains and the lowest on the plain.
- The  $^{137}\text{Cs}$  activity of some samples suggests the presence of accumulation processes that lead to soils enriched with  $^{137}\text{Cs}$ . Hence, monitoring to document the conditions several years after deposition is important. While processed soils are generally subject to attenuation, unprocessed semi-natural soils could undergo accumulation processes.

- The spatial distribution of  $^{40}\text{K}$  is rather variable and is affected by parent material characteristics and by potassium fertilization.

The results from this project provide a baseline to document the conditions present in 2011, which will be useful when assessing future effects due to external factors.

## 5. Acknowledgements

The authors would like to thank the numerous farmers for the permission to take samples and for providing helpful information. We also thank Paolo Lodigiani for help in the field work and for soil analyses and Fabrizio Speroni for assistance with the determination of the radionuclide activities.

This work was carried out as part of the “Soil Mapping” project, financially supported by the Regione Lombardia.

## 6. References

- Agnesod G., Operti C., Zappa C., Capodaglio P., 2006. Distribuzione comparata di Cesio-137 in diverse matrici ambientali sul territorio della Valle d'Aosta. ARPA Valle d'Aosta – Sezione Agenti Fisici Loc. Grande Charrière 44, 11020 Saint Christophe (AO).
- Annoni A., Luzet C., Gubler E., Ihde J. (Eds), 2001. Map Projections for Europe, EUR20120/EN
- APAT, 2004. Mapping Geology in Italy. APAT, Dipartimento Difesa del Suolo. Pasquaré G., Venturini C, Eds, Gropelli G. Assistant Ed., S.E.L.C.A. Firenze.
- APAT, 2005. The project Image and Corine land cover 2000 in Italy.
- ARPA Lombardia, 2003. Rapporto sullo Stato dell'Ambiente in Lombardia 2003. Capitolo 16. Radiazioni ionizzanti. RSA, pp. 173-186.
- ARPA Lombardia, 2006. Rapporto sullo Stato dell'Ambiente in Lombardia 2006. “Radiazioni ionizzanti: 20 anni dopo Chernobyl”. RSA, pp. 121-130.
- Blagoeva R., Zikovskiy L., 1995. Geographic and vertical distribution of Cs-137 in soils in Canada. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 27 No. 3, 269-274.
- Bossey P., Ditto M., Falkner T., Henrich E., Kienzl K., Rappelsberger U., 2001. Contamination of Austrian soil with caesium-137. *Journal of Environmental Radioactivity* 55, 187-194.
- Bunzl K., Albers B.P., Schimmack W., Belli M., Ciuffo L., Menegon S., 2000. Examination of a relationship between  $^{137}\text{Cs}$  concentrations in soils and plants from alpine pastures. *Journal of Environmental Radioactivity* 48, 145-158.
- Carré F., Rusco E., Tóth G., Jones A., Gardi C., Stolbovoy V., 2013. Soil sampling methodology. In: LUCAS Topsoil Survey: Methodology, data and results, G. Tóth, A. Jones and L. Montanarella (eds.), Report EUR 26102 EN, pp 3-8. doi: 10.2788/97922.
- Cenci R. M., 2008. Guidelines for the use of native mosses, transplanted mosses and soils in assessing organic and inorganic contaminant fallout. EUR 23292 EN. ISBN 978-92-79-08719-6. ISSN 1018-5593. 35 pp.
- Chiozzi P., Pasquale V., Verdoya M., 2002. Naturally occurring radioactivity at the Alps-Apennines transition. *Radiation Measurements* 35, 147 -154.
- De Capitani L., Carnevale M., Fumagalli M., 2007. Gamma-ray spectroscopy determination of radioactive elements in late-Hercynian plutonic rocks of Val Biandino and Val Trompia (Lombardia, Italy). *Periodico di Mineralogia* 76, 1, 25-39.
- De Cort M., Dubois G., Fridman Sh.D., Germenchuck M.G., Izrael Yu.A., Janssens A., Jones A.R., Kelly G.N., Kvasnikova E.V., Matveenko I.I., Nazarov I.M., Pokumeiko Yu.M., Sitak V.A., Stukin E.D., Tabachnyi L.Ya., Tsaturov Yu.S., Avdyushin S.I., 1998. Atlas of caesium deposition on Europe after the Chernobyl accident. EUR Report 16733, EC, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- De Jong E., Acton D.F., Kozak L.M., 1994. Naturally occurring gamma-emitting isotopes, radon release and properties of parent materials of Saskatchewan soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 74(1), 47-53.
- Debertin K., Helmer R.G., 1988. Gamma- and X-ray Spectrometry with Semiconductor Detectors, North-Holland, Amsterdam.
- Dos Santos Junior J.A., Ferreira Cardoso J.J.R., da Silva C.M., Vita Silveira S., dos Santos Amaral R., 2005. Analysis of the  $^{40}\text{K}$  levels in soil using gamma spectrometry. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol.48, Special : pp. 221-228, October 2005, ISSN 1516-8913.
- EUROSTAT, 2000. Manual of Concepts on Land Cover and land Use Information Systems. Theme 5: Agriculture and Fisheries: Methods and Nomenclatures. Office for official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2000, 110 pp.
- EUROSTAT, 2005. Guidelines for Geographic Data Intended for the GISCO Reference Database, Lovell Johns Ltd, Witney, UK, 3rd November 2005.
- Fortescue J.A.C., 1992. Landscape geochemistry - retrospect and prospect -1990. *Appl. Geochem.* 7, 1-53.
- IAEA, 2004. “Soil sampling for environmental contaminants”. International Atomic Energy Agency TECDOC-1415. Vienna, October 2004.
- ICRU, 2006. Sampling for radionuclides in the environment. *Journal of the ICRU*, Volume 6 No 1, ICRU Report No. 75. ISBN 0199211418. Oxford University Press.
- Jodłowski P., 2007. Correction factors to account for minor sample height variations in gamma-ray spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 580, 238-241.
- JRC, 2013. LUCAS Topsoil Survey: methodology, data and results. G. Tóth, A. Jones and L. Montanarella (eds.). Report EUR 26102 EN. doi: 10.2788/97922.
- Killet Software Ing.-GBR, <http://www.killetsoft.de/homee.htm>, 2014.
- Lettner H., Griesebner A., Peer T., Hubmer A.K., Pintaric M., 2006. Altitude dependent  $^{137}\text{Cs}$  concentrations in different plant species in alpine agricultural areas. *Journal of Environmental Radioactivity*, 86, 12-30.

- McKenzie N.J., Webster R., Ryan P.J., 2008. Sampling using statistical methods. In: McKenzie N.J., Grundy M.J., Webster R., Ringrose-Voase A.J. 2008. Guidelines for Surveying Soil and Land Resources. Second Edition. CSIRO Publishing, Melbourne, Australia. pp 317-326.
- Myttenaere C., Schell W.R., Thiry Y., Sombre I., Ronneau C., 1992. Modelling of the <sup>137</sup>Cs cycling in forest: recent developments and research needed. *Science of the Total Environment* 136, 77-91.
- Pourcelot L., Louvat D., Gauthier-Lafaye F., Stille P., 2003. Formation of radioactivity enriched soils in mountain areas. *Journal of Environmental Radioactivity* 68, 215–233.
- Schaub M., N. Konz, K. Meusbürger, C. Alewell (2010). Application of in-situ measurement to determine <sup>137</sup>Cs in the Swiss Alps. *Journal of Environmental Radioactivity* 101, 369-376.
- Strebl F., Tataruch F., 2007. Time trends (1986-2003) of radiocesium transfer to roe deer and wild boar in two Austrian forest regions. *Journal of Environmental Radioactivity* 98, 137-152.
- UNSCEAR, 1982. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. Ionizing radiation: sources and biological effects. Annex E: Exposures resulting from nuclear explosions.
- UNSCEAR, 2000. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. Annex B: Exposures from natural radiation sources.
- UNSCEAR, 2000. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. Annex C: Exposures to the public from man-made sources of radiation.

## 1.5 Conclusioni

Il monitoraggio dei suoli agricoli lombardi ha permesso di raggiungere i risultati prefissati. Innanzitutto abbiamo avuto modo di individuare le eventuali criticità presenti sul territorio (sforamenti dei limiti legislativi che possono essere ricondotti a situazioni naturali o a cause antropiche), e in secondo luogo abbiamo predisposto una base di conoscenza a cui fare riferimento nelle fasi successive d'indagine.

Dal punto di vista generale abbiamo ottenuto una caratterizzazione chimico-fisica dei 156 campioni prelevati, e in particolare abbiamo confrontato le concentrazioni degli elementi potenzialmente tossici con i limiti tabellari imposti dalla legge di riferimento, il Decreto Legislativo 152 del 2006 (D.Lgs. 152/2006), individuando e cercando di motivare gli eventuali sforamenti. Per fare ciò è necessario anche capire l'evoluzione dei suoli, la loro origine, determinando di quale categoria essi facciano parte. Il Testo Unico Ambientale (D.Lgs. 152/2006) prevede due tipologie di limiti da applicare a terreni a destinazione d'uso verde pubblico e privato, oppure a suoli destinati ad attività industriali. Anche se non è ben chiaro in quale delle due categorie rientrino i terreni agricoli, il limite più restrittivo viene determinato considerando i valori di fondo naturale dei diversi elementi considerati. Uno sforamento di questo limite è imputabile sia ad eventi naturali che non, mentre il limite più elevato sarebbe da collegare esclusivamente ad azione antropica.

In generale sono stati registrati diversi sforamenti dei limiti più restrittivi, specialmente per quanto riguarda nichel (Ni), zinco (Zn), cobalto (Co), arsenico (As) e rame (Cu). Il caso dello stagno (Sn) è piuttosto particolare, in quanto nella maggior parte dei siti campionati sfora il limite legislativo inferiore; questo è probabilmente dovuto ad un errore nell'individuazione del limite stesso. Quando i superamenti riguardano il limite tabellare A è difficile stabilire se la causa sia naturale o antropica, in quanto tale valore viene fissato sulla base del fondo naturale relativo ai diversi elementi. La concentrazione di fondo naturale degli EPT dipende strettamente dal materiale parentale, da dove i suoli superficiali hanno origine, ed è quindi possibile che vi siano delle situazioni locali in cui i valori di fondo di determinati elementi, come per esempio l'arsenico, siano naturalmente più elevati di quanto stabilito dalle normative di riferimento.

In un solo caso si è verificato il superamento del limite più elevato. Si tratta di un campione proveniente da una zona situata immediatamente a ridosso di un rilievo montuoso, e l'elemento in questione è l'arsenico. Possiamo quindi affermare che il numero totale di sforamenti registrati ed i valori relativi consentano di giudicare come buono il livello di qualità dei suoli agricoli lombardi dal punto di vista degli EPT.

Per quanto riguarda gli inquinanti organici si sono verificati solo tre superamenti del limite tabellare A del D.Lgs. 152/06 relativamente alla categoria degli agrofarmaci clorurati. In generale i dati ottenuti sono stati utilizzati per determinare la distribuzione degli xenobiotici organici a livello generale.

Anche per le attività enzimatiche analizzate in questa fase è stato possibile ottenerne la tendenza a livello regionale, utile per la valutazione delle informazioni derivanti dalle analisi sulle aree appartenenti alla seconda fase.

Nell'ambito della stesura di questa tesi si è voluto dare maggior spicco alla caratterizzazione che ha riguardato un particolare tipo di contaminanti: i radionuclidi gamma emittenti.

Dall'analisi gamma dei 156 campioni di terreno possiamo concludere che  $^{60}\text{Co}$  e  $^{134}\text{Cs}$  non sono rilevabili. Per quanto riguarda i punti esaminati non si è verificato né l'abbandono improprio di rifiuti pericolosi, quali quelli ospedalieri, né la presenza di elementi che possano far pensare a recenti incidenti nucleari nelle aree geograficamente vicine all'Italia.

Il  $^{137}\text{Cs}$  è distribuito in maniera ubiquitaria con livelli di attività molto variabili, mostrando valori maggiori nelle aree di montagna e minori in quelle di pianura. La distribuzione ricalca quella già documentata in seguito all'incidente di

Chernobyl, evidenziando ancor oggi che l'area maggiormente colpita è stata quella nei pressi del lago di Como, sulla sponda lecchese.

Dall'analisi è inoltre emersa la tendenza del  $^{137}\text{Cs}$  a migrare orizzontalmente oltre che verticalmente, determinando degli accumuli nelle zone orograficamente predisposte, originando quelli che ora si tende a definire "terreni arricchiti" di Cs 137. Da qui deriva un'ulteriore necessità di condurre analisi di monitoraggio, dovuta al fatto che terreni non soggetti alle lavorazioni potrebbero andare incontro ad un accumulo di questo pericoloso elemento.

Il potassio 40 è presente in tutta la regione in maniera proporzionale al contenuto totale dello stesso elemento, e dipende dal materiale parentale presente nelle diverse zone, oltre che dalle fertilizzazioni potassiche.

I risultati derivanti da questo approfondimento forniscono una linea di base che descrive la condizione relativa a questi radionuclidi nell'anno 2011, utile anche per fare previsioni circa i possibili sviluppi futuri.

### *BIBLIOGRAFIA*

- [1] EUROSTAT, 2000. Manual of Concepts on Land Cover and land Use Information Systems. Theme 5: Agriculture and Fisheries: Methods and Nomenclatures. Office for official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2000, 110 pp
- [2] CORINE LANDCOVER 2000 (ISPRA) <http://www.isprambiente.gov.it/temi/biodiversita/documenti/europea-e-mediterranea/corine-land-cover-clc>;
- [3] SRTM 90 M (Digital Elevation Database) <http://www.cgiar-csi.org/data/srtm-90m-digital-elevation-database-v4-1>;
- [4] Soil Atlas of Europe, 2005. [http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/projects/Soil\\_Atlas/Index.html](http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/projects/Soil_Atlas/Index.html)
- [5] Cenci R. M. (2008). Guidelines for the use of native mosses, transplanted mosses and soils in assessing organic and inorganic contaminant fallout. EUR 23292 EN. ISBN 978-92-79-08719-6. ISSN 1018-5593. 35 pp;
- [6] <http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/bfr.htm>
- [8][http://www.corriere.it/cronache/13\\_aprile\\_23/cinghiali-raddioattivi-chernobyl\\_a14ea92e-ac02-11e2-b753-2de04ad0a16e.shtml](http://www.corriere.it/cronache/13_aprile_23/cinghiali-raddioattivi-chernobyl_a14ea92e-ac02-11e2-b753-2de04ad0a16e.shtml)
- [9]<http://www.ilfattoquotidiano.it/2013/03/07/cinghiali-radioattivi-a-vercelli-trovate-tracce-cesio-137-attivati-nas-e-noe/523745/>
- [10]<http://www.lastampa.it/2013/03/08/scienza/ambiente/cinghiali-radioattivi-in-alta-valsesia-giallo-sul-cesio-nUHxlv1n49OBNqXXxE1fzI/pagina.html>
- [11][http://www.arpal.gov.it/index.php?option=com\\_flexicontent&view=items&cid=53:agenti-fisici&id=336:pellet-radioattivo&Itemid=343](http://www.arpal.gov.it/index.php?option=com_flexicontent&view=items&cid=53:agenti-fisici&id=336:pellet-radioattivo&Itemid=343)
- [12][http://www.arpa.umbria.it/resources/documenti/radiazioni\\_ionizzanti/Risultati%20analisi%20Pellet.pdf](http://www.arpa.umbria.it/resources/documenti/radiazioni_ionizzanti/Risultati%20analisi%20Pellet.pdf);  
[http://www.arpa.emr.it/documenti/arpavista/pdf2009n4/OpertiAR4\\_09.pdf](http://www.arpa.emr.it/documenti/arpavista/pdf2009n4/OpertiAR4_09.pdf)
- [13][http://www.arp.toscana.it/notizie/comunicati-stampa/2009/att-062009-pellet-radioattivi-aggiornamento2\\_23062009.pdf](http://www.arp.toscana.it/notizie/comunicati-stampa/2009/att-062009-pellet-radioattivi-aggiornamento2_23062009.pdf)

## CAPITOLO 2: CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA E BIOLOGICA DI UN SITO DI INTERESSE NAZIONALE IN REGIONE LOMBARDIA

### 2.1. La caratterizzazione chimico-fisica della zona di interesse

L'area presa in esame si trova ubicata in direzione sud-ovest rispetto alla città di Brescia. In tale zona, in seguito a caratterizzazioni eseguite da ARPA e ASL, è emersa la presenza di sostanze facenti parte della categoria dei PCB, diossine e altri inquinanti organici, oltre a diversi elementi quali mercurio ed arsenico, tutte in concentrazioni ben al di sopra dei limiti di legge. Ciò ha comportato l'inserimento dell'area nell'elenco dei Siti di Interesse Nazionale (SIN) nel 2003.

Per effettuare il campionamento è stato costruito un reticolo sull'intera area, con maglie quadrate di lato 200 m, all'interno del quale sono stati prelevati 8 punti (**Figura 2.1.1**).

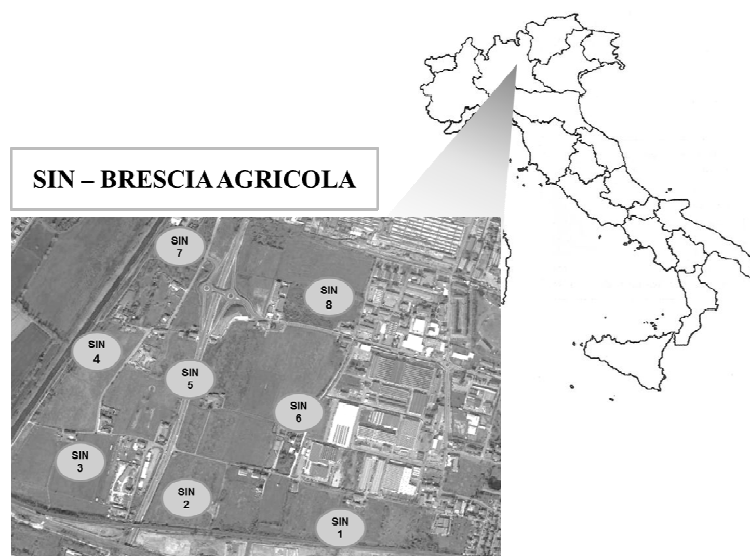


Figura 2.1.1. Posizione geografica e disposizione dei punti campionati

Tabella 2.1.1. Elenco dei parametri chimico- fisici analizzati nel sito SIN

Analisi chimico-fisiche	
°	<i>pH</i>
°	<i>Tessitura</i>
°	<i>Capacità di Scambio Cationico</i>
°	<i>C tot, organico e N</i>
°	<i>C inorganico</i>
°	<i>Macroelementi (Fe, Ti, Al, Si, Ca, K, P, Mg, Na )</i>
°	<i>EPT (As, Cd, Co, Mo, Sb, Se, Sn, Tl, V, Zn, Pb, Cr, Cu, Mn, Ni)</i>
°	<i>Hg</i>
°	<i>Diossine, PCBs, PCB diossino-simili</i>

Come previsto dalla legge nei SIN è proibito qualsiasi tipo di fruizione del territorio, perciò i terreni si presentavano incolti al momento del prelievo.

Dalle analisi effettuate (elencate in *Tabella 2.1.1*) è emerso che la zona è caratterizzata da un pH oscillante tra subalcalino ed alcalino, con valori compresi tra 7.5 e 8.0. La tessitura è mediamente composta da un 44% di sabbia, un 46% di limo ed un 10% di argilla, corrispondenti ad una tipologia di terreno franco. La capacità di scambio cationico è generalmente medio-elevata, cosa che, considerata assieme al pH, potrebbe indicare un tasso di saturazione basica prossimo al 100%.

Come riportato nella *Tabella 2.2* la sostanza organica presente è elevata; il rapporto C/N oscilla tra valori pari a 12,4 e 17,3, essendo quindi elevato in ogni punto. Questo è sintomo di una tendenza alla stabilizzazione della sostanza organica a causa del basso contenuto di azoto.

L'analisi di spettrometria a fluorescenza a raggi X ha rivelato un contenuto medio di magnesio maggiore rispetto al 95° percentile trovato in fase generale per la stessa categoria di suoli (1.2%). Lo stesso vale per il calcio; il terreno dell'area in questione rientra viene definito calcareo, data la percentuale di calcare superiore al 5% in diversi punti [1].

Tutti gli altri macroelementi hanno contenuti paragonabili ai valori riscontrati nei suoli lombardi.

Per quanto riguarda gli elementi potenzialmente tossici (*Tabella 2.1.4*), la situazione è critica, come già noto. In generale gli elementi che hanno mostrato superamenti dei limiti di legge sono: arsenico, tallio, rame, mercurio, zinco e piombo.

*Tabella 2.1.2. Parametri agronomici analizzati*

	CSC meq/100 g	N %	C %	Calcare %	C inorg %	C org %	C/N	SO %	pH	Argilla %	Limo %	Sabbia %
SIN 1	23	0,26	3,2	<0,20	<0,02	3,2	12,4	5,4	7,7	9,4	42	48,7
SIN 2	18	0,15	2,4	<0,20	<0,02	2,4	16,4	4,2	7,7	6,7	43,3	50
SIN 3	17	0,20	4,9	15,6	1,87	3,0	15,2	5,2	7,8	6,6	50,1	43,3
SIN 4	17	0,19	4,7	16,6	1,99	2,7	14,4	4,7	7,8	6,8	53,3	39,9
SIN 5	22	0,18	3,5	3,4	0,41	3,1	17,3	5,3	7,9	14,1	50,1	35,7
SIN 6	20	0,14	2,2	0,58	0,07	2,1	15,3	3,7	7,9	9,4	39,1	51,5
SIN 7	19	0,18	4,6	17,6	2,1	2,5	13,9	4,3	7,9	7,5	48,7	43,8
SIN 8	20	0,16	2,4	1,38	0,17	2,3	14,0	3,9	7,7	17,3	44,3	38,4

*Tabella 2.1.3. Percentuali relative al contenuto in macroelementi*

	Macroelementi								
	Na %	Mg %	Al %	Si %	P %	K %	Ca %	Ti %	Fe %
SIN 1	0,57	2,0	8,3	25	0,14	3,0	2,7	0,50	4,0
SIN 2	0,58	2,1	1,69	25	0,15	2,8	3,1	0,44	3,5
SIN 3	0,47	2,8	7,0	22	0,12	2,7	7,5	0,31	3,6
SIN 4	0,48	2,8	7,4	23	0,15	2,8	7,3	0,35	3,6
SIN 5	0,48	2,4	7,9	24	0,17	2,8	4,3	0,43	3,6
SIN 6	0,49	2,0	7,8	25	0,14	3,0	2,8	0,50	3,8
SIN 7	0,46	2,9	7,3	22	0,13	2,7	7,2	0,35	3,5
SIN 8	0,55	1,9	9,1	26	0,16	2,8	2,1	0,48	4,0

Tabella 2.1.4 . Valori relativi agli EPT indagati superiori ai limiti tabellari A e B D.Lgs. 152/2006 [2]

mg kg <sup>-1</sup>	Elementi Potenzialmente Tossici											
	As		Tl		Pb		Cu		Zn		Hg	
SIN 1	21	A	0,51		107	A	179	A	208	A	0,71	
SIN 2	30	A	0,43		89		69		147		1,64	A
SIN 3	141	B	0,76		183	A	222	A	361	A	12,6	B
SIN 4	123	B	0,82		201	A	136	A	291	A	4,8	A
SIN 5	53	B	0,76		168	A	134	A	240	A	6,7	B
SIN 6	24	A	0,46		92		71		135		1,47	A
SIN 7	21	A	0,64		139	A	75		199	A	0,39	
SIN 8	156	B	2,1	A	650	A	213	A	625	A	18,6	B

L'arsenico supera in 4 punti il limite legislativo tabellare A (20 mg kg<sup>-1</sup>): SIN7, SIN2, SIN6, SIN1. Nei restanti siti supera invece il limite B (50 mg kg<sup>-1</sup>), con concentrazioni fino tre volte superiori a tale limite. La media per l'arsenico dei valori riscontrati in questo sito è circa 70 mg kg<sup>-1</sup>. Nella fase generale tale elemento presentava un valore di fondo per i Luvisols (categoria pedologica in cui il SIN ricade) pari a circa 23 mg kg<sup>-1</sup>, e per i Cambisols disposti nella fascia settentrionale della regione di 30 mg kg<sup>-1</sup>, già superiori a quanto previsto dal limite A del D.Lgs. 152/2006. Questo sta a significare che in Italia, come noto, l'arsenico ha valori di fondo piuttosto alti per motivi geologici. I quattro punti SIN che superano il limite A si trovano in accordo con la situazione generale, mentre per quanto riguarda i punti la cui concentrazione supera il limite B, questa è ampiamente superiore ai valori di fondo regionali.

Da un punto di vista globale il contenuto di arsenico nei suoli superficiali varia da 0,1 a 93 mg kg<sup>-1</sup> negli Stati Uniti, da 4 a 150 mg kg<sup>-1</sup> nei suoli incontaminati del Canada, da 0,9 a 3,4 mg kg<sup>-1</sup> in Polonia e da 2 ad 80 mg kg<sup>-1</sup> in Bangladesh [3]. I composti dell'arsenico sono facilmente solubili, ma la loro grande mobilità è limitata dall'adsorbimento da parte dei minerali argillosi, dagli idrossidi e dalla sostanza organica. L'arsenico in natura si presenta in diversi stati di ossidazione. Esso è presente come As(0) e As(III) in ambienti riducenti, e la seconda specie è ben più tossica e mobile rispetto all'As(V) [3]. Le sorgenti antropiche di tale elemento sono: attività industriali coinvolte nella lavorazione dei metalli, e quelle chimiche basate su minerali contenenti fosforo e zolfo; combustione di carbone e l'uso di agrofarmaci, oltre che dall'acqua di irrigazione e dallo spandimento di fanghi di depurazione delle acque reflue [3].

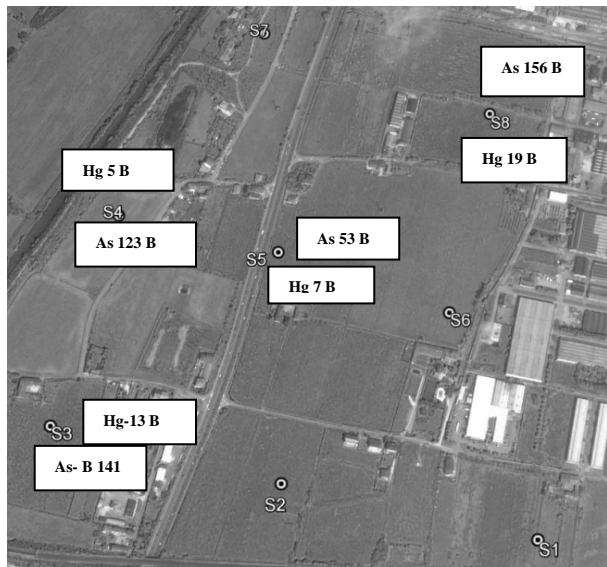
Altro elemento la cui concentrazione è superiore ai limiti di legge è il mercurio (Hg), il quale dovrebbe essere al di sotto di 1 mg kg<sup>-1</sup> per il limite A, e al di sotto di 5 mg kg<sup>-1</sup> per il limite B. Sei punti su otto sfiorano tali limiti, due l'A e quattro il B. E' opportuno notare che questi ultimi sono gli stessi che hanno superato il limite B per l'arsenico. La contaminazione da mercurio in questo sito è nota, e non ha origini naturali. Dando uno sguardo ai valori riscontrati e paragonandoli a quelli ottenuti nella fase generale se ne ha ulteriore conferma. Il SIN ha infatti una concentrazione media di mercurio pari a circa 6 mg kg<sup>-1</sup> contro 0,12 mg kg<sup>-1</sup> a livello dell'intera regione.

Il mercurio è ritenuto un inquinante globale, le cui caratteristiche lo hanno portato ad essere inserito nella lista degli "hazardous air pollutants" contenuta nell' US Clean Air Act Amendments (1990). Le motivazioni risiedono nella sua tossicità, disponibilità, potenziale bio-accumulazione all'interno dei comparti ambientali ed al rischio per la salute

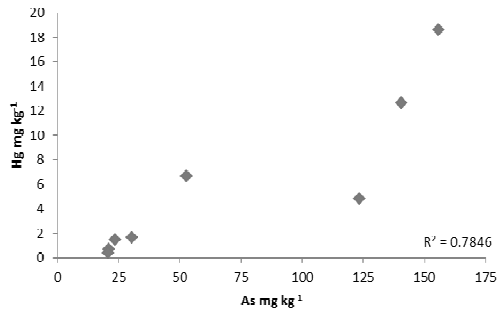


umana. La concentrazione media del mercurio a livello mondiale varia tra 0,58 e 1,8 mg kg<sup>-1</sup>, essendo maggiormente presente nei Cambisols ed Histosols, e nelle zone adiacenti alle aree ospitanti miniere o depositi di rifiuti [3].

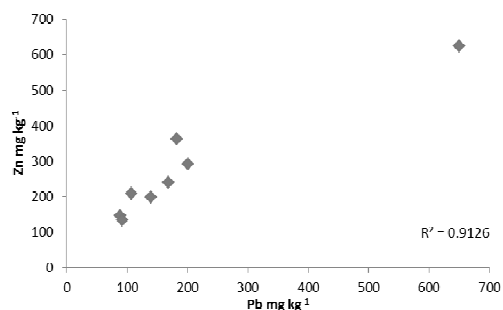
Sembra inoltre che la presenza di arsenico e mercurio nei punti a maggior concentrazione, ricalchi una plume di dispersione, come è possibile notare nella **Figura 2.1.2**. In **Figura 2.1.3 a)** è invece riportato il grafico della correlazione tra i due elementi.



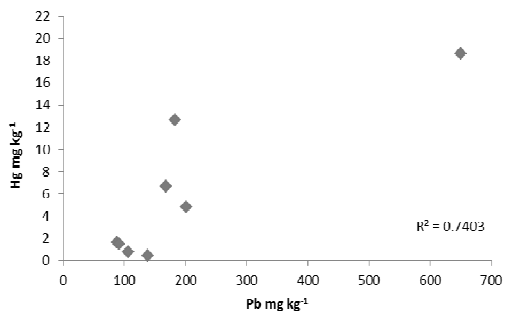
**Figura 2.1.2.** Punti a maggior concentrazione di arsenico e mercurio



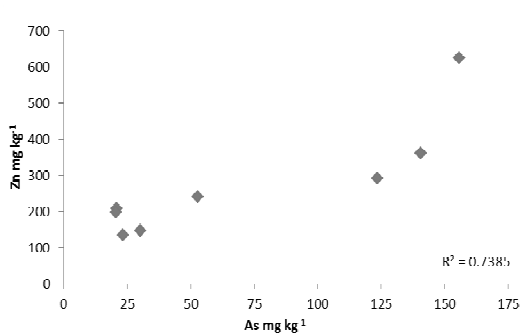
a)



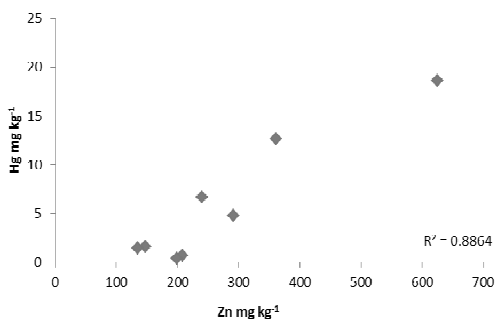
b)



c)



d)



e)

**Figura 2.1.3. Grafici di correlazione fra le concentrazioni di arsenico, mercurio, piombo e zinco relative all'area SIN**

Anche zinco (Zn) e piombo (Pb) hanno superato i limiti di legge previsti. Lo zinco in sei casi su otto (SIN1, SIN3, SIN4, SIN5, SIN7 e SIN8) ha superato il limite A pari a  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ , con una media di  $276 \text{ mg kg}^{-1}$ . Tale valore è doppio rispetto a quello che rappresenta il fondo dei terreni Luvisol da noi trovato in fase generale. Il piombo supera il limite A esattamente negli stessi punti visti per lo zinco. Esso ha mostrato valori pari al doppio e perfino a sei volte il limite di  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . Rispetto al fondo la media di  $203 \text{ mg kg}^{-1}$  è più che doppia. Vale la pena notare che in tutti i casi il valore più elevato è stato riscontrato nel punto s8 (Tabella 2.1.4). Anche il rame ha riportato concentrazioni superiori ai limiti di legge, e sempre negli stessi punti già precedentemente citati, con una media pari a  $137 \text{ mg kg}^{-1}$  rispetto al limite di  $120 \text{ mg kg}^{-1}$ . Il valore di fondo per i suoli Luvisol è invece pari a  $46 \text{ mg kg}^{-1}$ . Il tallio ha superato il limite A di  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  con un valore pari a  $2,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , nel punto SIN8. Gli altri punti sono invece omogeneamente distribuiti intorno a  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  ed abbastanza in linea con i valori di fondo. In generale anche per gli elementi dove non sono stati riscontrati superamenti ai limiti di legge, il punto s8 ha dimostrato di possedere concentrazioni più elevate e diverse rispetto alle medie. Questo vale per i seguenti elementi: cobalto, selenio, cadmio, antimonio, nichel e stagno. Se si escludono tali valori, il sito SIN, in merito agli elementi appena citati, è in linea con i valori di fondo dei Luvisols.

La Tabella 2.1.5 riporta i dati relativi alle concentrazioni dei composti organici rilevati nel sito SIN. Da un confronto con i limiti di legge si evince che, per quanto concerne le diossine solo il SIN7 ne è al di sotto. Per i composti diossino-simili ci siamo riferiti allo stesso limite legislativo imposto alle diossine, per mancanza di un riferimento di legge ad essi specificamente attribuito; in questo caso nessun punto ne è al di sotto. La maggior parte dei punti supera il limite tabellare B. Per i PCB solo il SIN3 supera il limite A.

*Tabella 2.1.5. Concentrazioni degli inquinanti organici del sito SIN (\*DLgs. 152/2006)*

	diossine I-TEQ (ng kg <sup>-1</sup> )	DL-PCB WHO <sub>05</sub> -TEQ (ng kg <sup>-1</sup> )	PCB (ng g <sup>-1</sup> )
SIN 1	20	19.4	285
SIN 2	37	17.4	527
SIN 3	405	72	5179
SIN 4	132	19.9	1013
SIN 5	229	21	1007
SIN 6	14.4	8.7	234
SIN 7	9.0	3.2	44
SIN 8	544	58	2647
Limite A*	10	60	10
Limite B*	100	5000	100

## **2.2 La speciazione e la disponibilità degli elementi**

Il suolo si compone di vari costituenti chimici inorganici ed organici, semplici e complessi, acidi fulvici ed umici, minerali inorganici e fasi organiche condensate (ad esempio umine, microflora, piante, bitumi...) che possono partecipare a scambi con la soluzione acquosa circolante. La sostanza organica è un buon agente di complessazione per la maggior parte dei cationi divalenti e trivalenti; questa sua capacità dipende dai gruppi funzionali contenenti ossigeno, ed è influenzata dal pH. Oltre a complessare, la sostanza organica è anche un agente riducente di metalli cationici e poli-anionici, le cui forme ridotte vengono in seguito incorporate tramite fissazione sui gruppi funzionali. Assieme al pH fattori quali il potenziale redox, la presenza di sostanza organica e l'attività microbica incidono sulla concentrazione, mobilità, alcuni processi di accumulo e sulle trasformazioni che interessano i diversi elementi. La composizione isotopica, la struttura elettronica, lo stato di ossidazione, l'eventuale complessazione o struttura molecolare definiscono la specie chimica di un elemento. Per speciazione si intende la distribuzione di un elemento fra definite specie chimiche in un sistema [4].

Il Sito di Interesse Nazionale di Brescia ha mostrato la presenza di un'elevata concentrazione totale e "pseudototale" di mercurio ed arsenico. L'approfondimento che ci siamo proposti di fare a riguardo era la definizione della reale pericolosità di questi due elementi.

L'arsenico è un metalloide ampiamente distribuito nell'ambiente (rocce, suoli, sedimenti, acqua di mare, superficiale e sotterranea, atmosfera ed organismi viventi), il cui ingresso nelle acque superficiali e potabili crea ripercussioni sulla salute umana in diverse parti del mondo. La pericolosità dell'arsenico è legata alla sua forma chimica (organica, inorganica) ed al suo stato di ossidazione, così come la sua mobilità. I cicli redox che possono avvenire nel suolo e nei sedimenti sono fra le prime cause di passaggio dell'arsenico nelle acque. La sua pericolosità è maggiore in forma inorganica ed allo stato di ossidazione III. L'arsenico inorganico è stato classificato come appartenente al gruppo 1 delle sostanze cancerogene per l'uomo [5]. Visto il livello di contaminazione presente nell'area in esame abbiamo deciso di approfondire la caratterizzazione del sito concentrando l'attenzione soprattutto su questo elemento, valutando la sua disponibilità e le diverse forme presenti. La procedura è illustrata nel paragrafo successivo.

### **✓ 2.2.1 Analisi della concentrazione di arsenico e sua speciazione attraverso l'uso dei dispositivi DGT (Diffusive Gradient in Thin Films)**

I DGT sono dispositivi in grado di accumulare sostanze disciolte, quali gli elementi potenzialmente tossici (EPT) da noi indagati, restituendo poi un valore equivalente alla frazione bioaccessibile (disponibile) dell'elemento. Essi contengono uno strato di resina in grado di trattenere gli analiti, immerso in un layer diffusivo di idrogel, a sua volta a contatto con un filtro (**Figura 2.2.1**). Queste diverse parti sono contenute all'interno di una capsula di plastica, la cui parte a contatto con il terreno (finestra) ha un diametro di 2 cm, mentre la base opposta di 2,5 cm. La resina ha uno spessore di 0,4 mm, il gel diffusivo di 0,8mm ed il filtro 0,135mm.

Messi a contatto con il suolo per 24 ore a temperatura controllata, e recuperatane successivamente la resina, se ne determina il contenuto tramite analisi di spettrometria di massa, previa estrazione. La resina ferrihydrite permette di mantenere inalterate le forme chimiche di arsenico investigate [17]

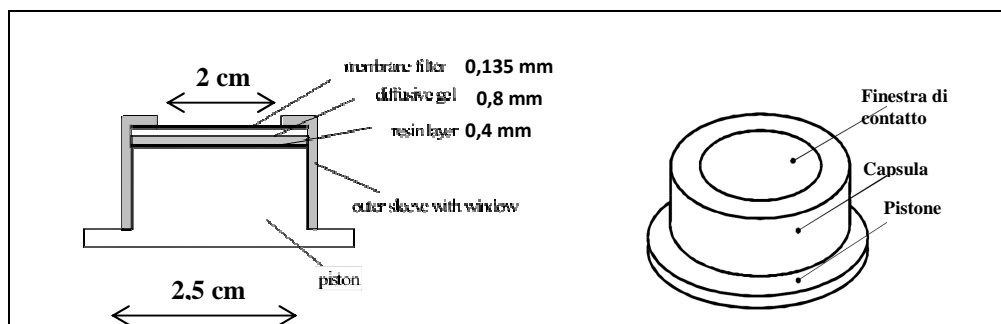


Figura 2.2.1 Immagine esplicativa della struttura del dispositivo DGT (Diffusive Gradient in Thin Films)

I DGT sono stati inventati a Lancaster da Bill Davison e Hao Zhang. La sigla DGT sta per: “diffusive gradient in thin films”. Nel nome è racchiuso il suo meccanismo di funzionamento. Questo innovativo dispositivo di plastica consente di quantificare attraverso le classiche tecniche di laboratorio, la concentrazione accumulata in maniera controllata di elementi e sostanze presenti nelle soluzioni dalla resina, quali metalli in traccia, fosfati, solfati e radionuclidi, sia in termini di concentrazioni disponibili (bioaccessibili), che di flussi nel suolo, nei sedimenti e nelle acque. Esso può essere utilizzato *in situ* o *ex situ*.

La misura che si compie attraverso l’uso dei DGT è quella del flusso medio di specie labili, durante un certo lasso di tempo. Per un certo tipo di resina, e per la durata temporale del contatto, la concentrazione trovata nell’interfaccia (resina) può essere direttamente correlata con l’effettiva concentrazione del metallo labile [6]. Questa concentrazione dipende da qualsiasi fonte di quel determinato elemento: sia la fase solida, che la soluzione circolante del suolo. Il rilascio di un elemento dalla fase solida dipende dalla costante di velocità per il trasferimento in soluzione, e dalle dimensioni del pool labile in fase solida. Questi due fattori vengono considerati ed espressi tramite un coefficiente di diffusione  $D$ .

La composizione della resina viene scelta in funzione dell’analita investigato. Ad esempio per la quantificazione dei metalli si usa la resina Chelex. Nel nostro caso la resina utilizzata è costituita da ferrihydrite, (FH-DGT) specifica per la determinazione delle forme di arsenico e fosfati [17, 18]. Essa si trova a contatto con uno strato di idrogel di poliacrilammide ed un filtro, attraverso il quale fluiscono gli analiti, per giungere alla resina ed accumularvisi.

Per il loro utilizzo i DGT devono essere inseriti nel suolo una volta che questo abbia raggiunto la capacità di campo. Nel caso di una applicazione in laboratorio è necessario disporre di un certo quantitativo di terreno, il quale va saturato e ben mixato, in modo da assicurare l’omogeneità. Il contenitore utilizzato può essere un semplice fondo di bottiglia in plastica, forato in modo da lasciare defluire l’acqua in eccesso. Lo spazio sufficiente è costituito da 2 cm tra il filtro ed i lati del contenitore, per un’esposizione di 24 ore. Affinché il contatto con il suolo sia ottimale ed efficace, è necessario che non permangano bolle d’aria e che il terreno non fuoriesca dai fori.

Il principio di funzionamento di tali dispositivi è brevemente descritto di seguito [7]. La resina contenuta nei DGT lega i soluti diffusi attraverso il gel diffusivo, rimuovendoli dalla soluzione circolante. Questo crea all’interno di tale gel un gradiente di concentrazione lineare, che a sua volta dà luogo ad un flusso costante verso la resina, che determina il tasso di accumulo nella stessa, dal quale verrà calcolata la concentrazione dell’analita all’esterno del dispositivo. La concentrazione dell’analita nella soluzione circolante adiacente al DGT viene progressivamente diminuita dal flusso verso lo strato di idrogel, coinvolgendo via via le zone adiacenti. Gli analiti migrano verso lo strato di terreno più adiacente al filtro, generando un flusso guidato dal gradiente di concentrazione formatosi all’interno del gel diffusivo,

diminuendo di quantità col passare del tempo: la diminuzione di concentrazione nella soluzione circolante immediatamente prossima allo strato diffusivo genera una mobilitazione di soluti dalla fase solida.

La quantità di analita che verrà quantificata nella resina, costituisce la massa di elemento accumulata per unità di area della resina stessa. Tale valore diviso per il tempo di contatto dà il flusso medio temporale dalla soluzione circolante alla resina.

In base a quanto previsto a livello teorico abbiamo proceduto operativamente miscelando i nostri campioni di terreno dopo averli saturati con acqua, e lasciandoli a contatto per 24 ore coperti con parafilm. Trascorso tale periodo di tempo abbiamo applicato i dispositivi DGT, creando un replicato per ogni campione, e ponendoli nel termostato a 23°C per altre 24 ore. Al termine abbiamo preso nota del tempo effettivo di contatto trasformandolo in secondi, ed è stata recuperata la resina successivamente sottoposta ad estrazione utilizzando 15 ml di HNO<sub>3</sub> (63% Sigma, suprapur) 0,28 M con piastra di grafite Digiprep (DIGIPREP, Scp Science, Quebec, Canada), per 90 minuti a 95°C. Questa combinazione consente di mantenere intatta la speciazione dell'arsenico contenuto nella resina, così come riportato in [15, 16, 17].

In seguito alla mineralizzazione si è proceduto ad effettuare una diluizione prelevando 2 ml di campione ed aggiungendo 4 ml di H<sub>2</sub>O MilliQ.

Sui campioni così preparati abbiamo eseguito un'analisi di speciazione attraverso HPLC-ICP-MS (HPLC 1100 Agilent Technologies, Tokyo, Japan), con una colonna a scambio anionico PRP-X100 (Hamilton). Le specie indagate sono: As(III), As(V), monometil-arsano (MMA) e dimetil-arsano (DMA). La fase mobile utilizzata era composta dal 66% di acido ortofosforico (pH 6 con NH<sub>3</sub> al 30% v/v) 80 mM, 32% metanolo e 2% H<sub>2</sub>O MilliQ.

Per il calcolo delle concentrazioni di arsenico contenute nei DGT è stato necessario partire dai valori ottenuti dall'analisi di speciazione. La concentrazione dell'arsenico (C<sub>e</sub>) così ottenuta, per ogni specie, moltiplicata per il volume di acido (Vol) usato in fase di mineralizzazione, e diviso per il fattore di eluizione (f<sub>e</sub>) pari a 0,8, restituisce la massa dell'elemento intrappolata nella resina:

$$M = \frac{C_e * Vol}{f_e}$$

La concentrazione dell'arsenico nella soluzione circolante ottenuta con il dispositivo è poi data dalla seguente formula:

$$C = \frac{M * \Delta g}{D * A * t}$$

dove M è la massa calcolata in precedenza, g lo spessore dato dallo strato di gel diffusivo e dal filtro (0,8+0,135 mm), t è il tempo di esposizione espresso in secondi, A l'area del esposto (3,14 cm<sup>2</sup>), e D il coefficiente di diffusione.

Quest'ultimo parametro deve essere riferito alle quattro specie indagate. Nel nostro lavoro abbiamo considerato dei valori ottenuti da Fontanella et al.[8] per le forme inorganiche, mentre per MMA e DMA i valori sono stati recuperati da Österlund 2012 [9] (Tabella 2.2.2).

Tabella 2.2.2. Valori dei coefficienti di diffusione D per le diverse specie di arsenico.

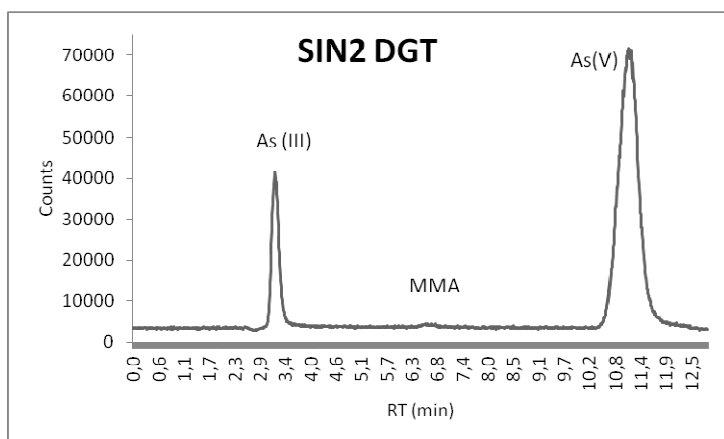
Specie	Coefficiente D ( *10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> *s <sup>-1</sup> ) a 23°C
As(III)	4,90 ± 0,05
As(V)	5,95 ± 0,30
DMA	6,30 ± 0,52
MMA	6,10 ± 0,21

Nella *Tabella 2.2.3* sono riportati i risultati ottenuti, mentre la **Figura 2.2.2** mostra un esempio di cromatogramma ottenuto per un campione, con i due picchi relativi all'arsenico inorganico (As(III) ed As(V)), ed un piccolo picco corrispondente all'MMA. La quantità totale di arsenico presente nelle soluzioni analizzate è principalmente costituita dall'As(V).

*Tabella 2.2.3. Speciazione dell'arsenico e percentuale rilevata mediante i dispositivi DGT.*

	Cdgt As(III) $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cdgt As(V) $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cdgt DMA $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cdgt MMA $\mu\text{g kg}^{-1}$	tot $\mu\text{g kg}^{-1}$	pseudo-tot (A.R.) $\mu\text{g kg}^{-1}$	% As AR in soluzione
SIN1	13,30	6,23	4,42	0,46	24,41	21000	0,12
SIN2	21,30	89,01	11,13	0,39	121,82	30000	0,41
SIN3	13,74	54,46	11,34	0,70	80,24	141000	0,06
SIN4	21,92	264,39	12,82	1,00	300,13	123000	0,24
SIN5	15,88	161,66	10,95	0,96	189,44	53000	0,36
SIN6	18,68	24,64	8,86	0,40	52,59	24000	0,22
SIN7	8,36	12,76	9,00	0,39	30,51	21000	0,15
SIN8	21,37	448,51	13,87	1,07	484,82	156000	0,31

Il D.Lgs. 152 del 2006 stabilisce che il limite di contaminazione delle acque sotterranee per l'arsenico totale è pari a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb), mentre, come già accennato, per i terreni siamo nell'ordine dei  $\text{mg kg}^{-1}$  (ppm). Si evince quindi che la quantità di arsenico totale ritrovata nelle soluzioni estratte attraverso l'uso dei DGT supera il limite di legge per tutti i campioni. Le concentrazioni determinate mediante questi dispositivi rappresentano infatti le quantità che sono in grado di passare dalla fase solida al comparto acquoso.



**Figura 2.2.2. Cromatogramma di analisi di un campione raffigurante i picchi relativi alle diverse specie di arsenico presenti.**

## 2.3 Caratterizzazione biologica del sito SIN

La Tabella 2.3.1 mostra l'elenco dei parametri biologici caratterizzati nell'area SIN.

Tabella 2.3.1. Elenco dei parametri biologici analizzati nell'area SIN

Parametri biologici	
○	<i>Valutazione della biodisponibilità dei composti diossino-simili e delle diossine</i>
○	<i>Valutazione potenziale genotossico</i>
○	<i>Attività microbica e fertilità biologica</i>
○	<i>Attività enzimatica</i>
○	<i>Caratterizzazione comunità protozoi ciliati</i>
○	<i>Caratterizzazione comunità lombrichi</i>

Dal punto di vista chimico-fisico l'area SIN è sicuramente la zona maggiormente impattata per la presenza di diversi EPT e xenobiotici organici, con concentrazioni superiori ai limiti di legge.

I parametri biologici indagati successivamente hanno permesso di fare alcune considerazioni circa l'impatto che un tale livello di contaminazione può avere su diversi organismi viventi, e di conseguenza sulla salute del suolo.

La **Figura 2.3.1** mostra i risultati ottenuti dal test condotto con il biosensore (DR-CALUX) per verificare la risposta alla presenza e disponibilità delle diossine e dei composti diossino-simili. Il sito SIN5 è quello che ha determinato la maggior risposta in termini di concentrazione totale delle sostanze indagate, mentre il SIN3 ha presentato la loro maggior biodisponibilità, seguito dal SIN8.

Per quanto riguarda la valutazione del potenziale genotossico delle sostanze presenti nel suolo, nel complesso i risultati ottenuti indicano la presenza di sostanze potenzialmente genotossiche nel suolo, che non influiscono sulla sopravvivenza e crescita del bioindicatore usato (trifoglio) perché probabilmente sono poco biodisponibili. Il tipo di contaminazione qui presente dovrebbe indurre un elevato danno genotossico. Si riscontra invece un danno moderato in quanto il pH alcalino limita sicuramente la biodisponibilità degli inorganici e probabilmente molti congeneri di PCB presenti possiedono un alto numero di atomi di cloro che li rende meno biodisponibili rispetto ai PCB a bassa clorazione. L'unico punto per il quale si ha un risultato che rientra nella classe di valutazione "genotossico" è il SIN8, il sito maggiormente contaminato. Il disturbo si manifesta a livello radicale.

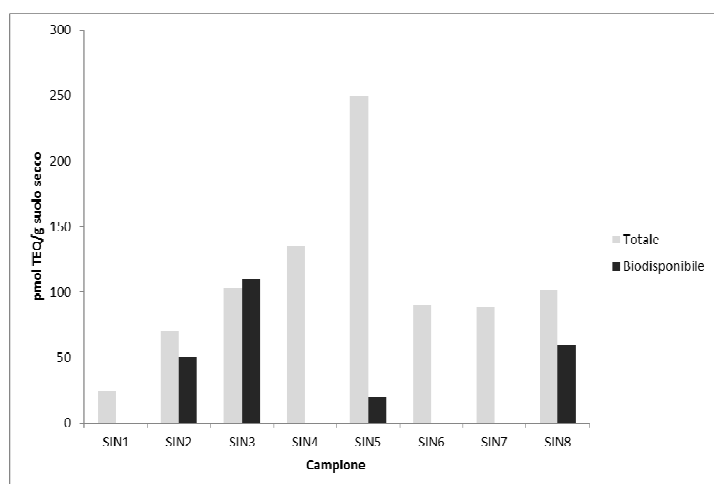


Figura 2.3.1. Risposta del biosensore DR-CALUX alla frazione totale e biodisponibile nei campioni del sito di interesse nazionale (SIN) di Brescia

Tabella 2.3.2. Risultati parametri biologici sito SIN. Som(Sostanza Organica); Toc(Carbonio Organico); Resp\_bas(Respirazione basale); Resp\_Cum(Respirazione Cumulativa); C\_micr(Biomassa Microbica; Qm (quoziente di mineralizzazione); qCO2(quoziente metabolico); Ibf(ndice di fertilità biologica). P: punteggio assegnato al parametro.

sigla	CO %	P	Res Bas ppm	P	Res Cum %	P	Cmicr ppm	P	qM %	P	qCO <sub>2</sub> 10 <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup>	P	Fertilità	IBF
SIN1	2,4	4	8,1	2	329	3	4,3	1	1,4	2	7,8	1	media	13
SIN2	1,6	3	6,4	2	279	3	51	1	1,7	2	0,52	1	stess	12
SIN3	2,3	4	6,3	2	269	3	26	1	1,2	2	0,99	1	media	13
SIN4	2,3	4	15,4	4	328	3	115	2	1,4	2	0,56	1	media	16
SIN5	2,0	4	11,4	3	388	3	34	1	1,9	2	1,41	1	media	14
SIN6	1,4	2	8,8	2	289	3	12	1	2,1	3	3,0	1	stress	12
SIN7	2,3	4	13,5	3	282	3	237	2	1,2	2	0,24	3	media	17
SIN8	2,0	4	13,6	3	302	3	58	1	1,5	2	0,97	1	media	14

Dal punto di vista della fertilità biologica tutti i punti hanno mostrato condizioni medio-basse. Due siti vertono in stati di stress-preallarme. Per arrivare a tale definizione sono stati presi in considerazione e valutati i seguenti parametri:

- TOC: carbonio organico totale; da tale valore è possibile ricavare il tenore in sostanza organica;
- Cmicr: è il carbonio immobilizzato nella biomassa microbica, rappresentandone una misura diretta di quantità;
- Res bas: respirazione basale, stima della attività metabolica della popolazione in termini di anidride carbonica prodotta;
- qM: quoziente di mineralizzazione dell'azoto e successivo rilascio come forma inorganica dalla sostanza organica del suolo;
- qCO<sub>2</sub>: quoziente metabolico, relaziona l'attività e la dimensione della biomassa microbica.

Anche il coefficiente microbico Cbio è un importante mezzo attraverso il quale valutare la salute della popolazione microbica presente [9]. Si tratta del rapporto percentuale tra il C microbico e il C organico relativi ad ogni punto. La Tabella 2.3.3 mostra i valori ottenuti. Come è possibile notare solo in SIN7 il Cbio assume un valore normale, in accordo con il maggior punteggio di IBF ottenuto dallo stesso punto. Per tutti gli altri siti il Cbio è decisamente basso.

Tabella 2.3.3. Valori di Cbio dei punti del sito SIN

punto	SIN1	SIN2	SIN3	SIN4	SIN5	SIN6	SIN7	SIN8
Cbio (%)	0,02	0,32	0,11	0,5	0,17	0,08	1,03	0,29

Occorre segnalare che la popolazione microbica presente nell'area SIN è la più bassa delle sette aree indagate nella seconda fase del progetto. Tutti i punti campionati ricadevano in terreni incolti dal 2003 (anno di inserimento nella lista dei Siti di Interesse Nazionale). Il cambio di uso del suolo può aver influenzato negativamente questo parametro.

In generale nell'area SIN la disponibilità di sostanza organica è abbastanza alta, ma abbiamo già avuto modo di constatare che la carenza di azoto comporta una difficoltà di utilizzo da parte dei batteri, come appare dai tenori assunti dal quoziente di mineralizzazione qM nella Tabella 2.3.2. La stessa conclusione viene supportata anche dai valori di attività enzimatiche ottenuti ed illustrati in seguito. I grafici radar nella Figura 2.3.2 riassumono i valori ottenuti per i parametri facenti parte del calcolo dell'IBF.



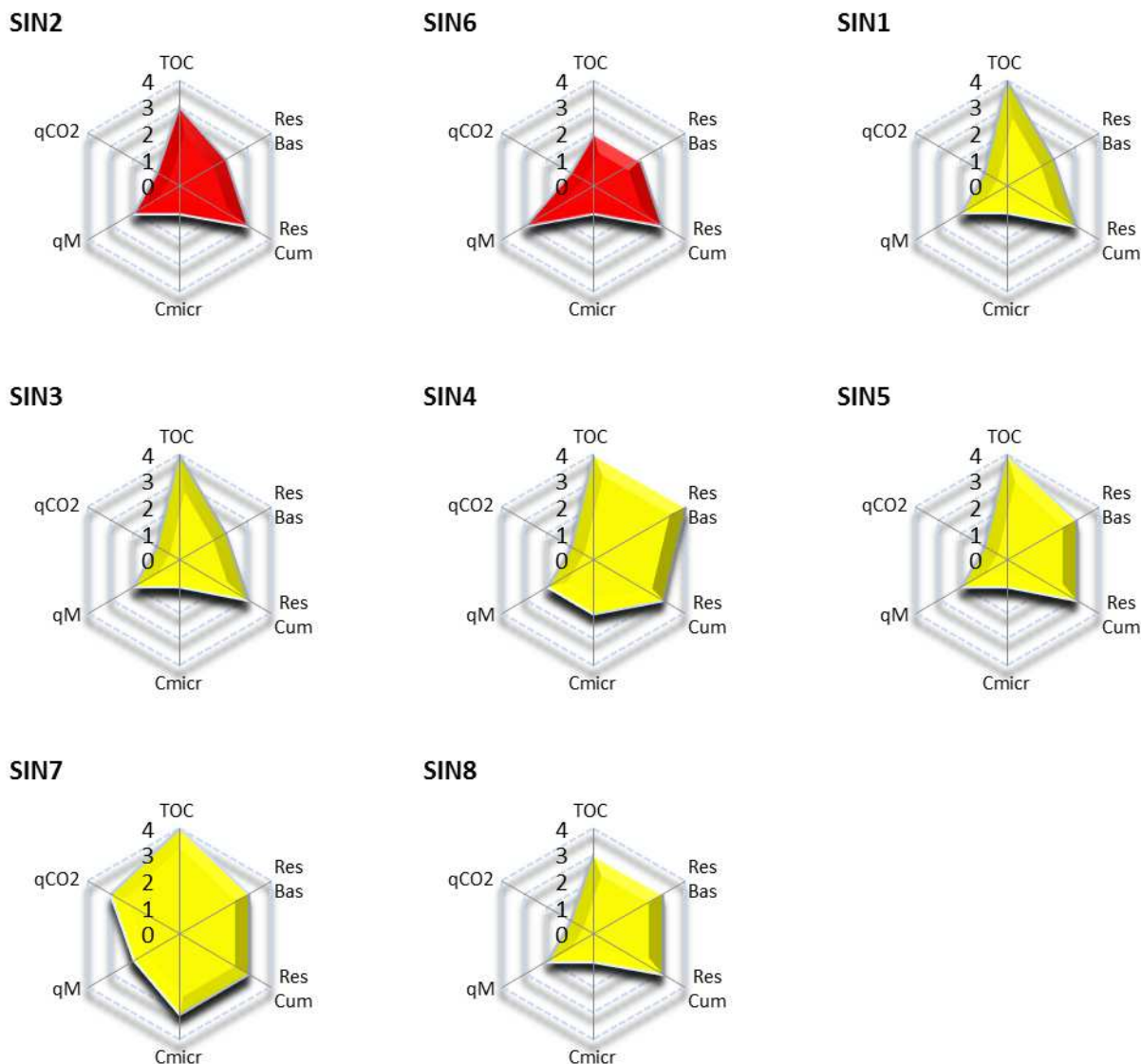


Figura 2.3.2. Grafi radar costruiti a partire dai diversi parametri costituenti l'indice di fertilità biologica (IBF) relativi ai punti SIN

Le attività enzimatiche analizzate sono state rapportate alla quantità in g di carbonio organico di ogni campione. La Tabella 2.3.4 ne riassume i risultati. Nell'area SIN le attività della leucina aminopeptidasi e dell'esterasi rientrano nella terza classe di valutazione. Ciò significa che sono comprese tra i valori più bassi fra quelli riscontrati per l'intera regione, situandosi fra il 25° ed il 50° percentile. La risposta dell'esterasi, come già accennato, è la più generale ed esplicativa della situazione complessiva. La leucina aminopeptidasi è invece correlata con la presenza di azoto, ed in questo caso i suoi bassi valori sono ben correlati con quanto riscontrato attraverso il calcolo del rapporto C/N. Abbiamo visto infatti che in tutta l'area SIN tali valori sono al di sopra dell'optimum (compreso tra 9 e 11), situazione che sta a indicare una certa tendenza alla persistenza della sostanza organica in campo a causa della carenza di azoto. Fra le tre attività rappresentate la betaglucosidasi è quella che raggiunge valori più elevati; le glucosidasi rappresentano gli enzimi chiave del ciclo del carbonio. Idrolizzano la sostanza organica liberando residui glicosidici (glucosio o galattosio) utilizzati dai microrganismi del suolo come fonte energetica. Tale attività in molti suoli risulta significativamente correlata con le pratiche agronomiche. Occorre considerare che i terreni in questione sono incolti.

Sorprendentemente la correlazione con gli inquinanti inorganici non ha mostrato risultati significativi. Questo significa che il notevole contenuto totale di alcuni inquinanti, come ad esempio il mercurio, anche quando presente in quantità piuttosto rilevanti, non ha provocato riduzioni significative dei parametri biologici. Come abbiamo già notato esaminando i risultati relativi all'attività microbica, sono solo due i siti in condizioni di stress. Questo risultato può essere spiegato in diversi modi. Innanzitutto la forma chimica in cui sono presenti gli elementi tossici potrebbe essere relativamente poco disponibile per i microrganismi; molto probabilmente il pH piuttosto elevato gioca un ruolo determinante. In secondo luogo potrebbe esservi stata una selezione dei microrganismi del terreno. Ovviamente una causa non esclude l'altra.

Tabella 2.3.4. Attività enzimatiche riscontrate nell'area SIN (da sinistra: fosfomonoesterasi acida, fosfodiesterasi, pirofosfato-fosfodiesterasi, leucina aminopeptidasi, arisulfatasi, chitinasi, betaglucosidasi, acetato esterasi, fosfomonoesterasi alcalina) (nanomoli di 4-metilumbelliferone per g di CO)

	acP	bisP	piroP	leu	aryS	chit	b-gluc	ester	alkP
SIN 1	1774	1204	222	855	63	253	380	71337	7761
SIN 2	1905	1656	290	1035	41	538	456	71846	9690
SIN 3	1024	660	132	859	33	66	429	49766	5845
SIN 4	1368	1035	185	1183	37	259	481	59384	7136
SIN 5	1461	1234	195	844	32	227	422	55101	8247
SIN 6	1584	1025	186	1118	47	280	466	53899	7034
SIN 7	1727	1165	281	1325	40	120	482	63814	7871
SIN 8	1330	931	133	1152	44	310	753	59785	8553

Per quanto riguarda la caratterizzazione della comunità dei protozoi ciliati nel sito SIN, l'analisi relativa allo studio della composizione tassonomica ha consentito di identificare per gli 8 punti campionati, un totale di 46 specie di protozoi ciliati, rappresentanti 20 generi e 10 ordini (*Stichotrichida*, *Sporadotrichida*, *Urostylida*, *Heterotrichida*, *Armophorida*, *Haptorida*, *Colpodida*, *Cyrtolophosidida*, *Microthoracida*, *Chlamyodontida*). L'analisi SIMPER ha messo in evidenza le 12 specie che forniscono un contributo cumulativo pari a circa il 73% alle comunità di ciliati presenti nel sito, e che per tale motivo sono state definite come "dominanti" ed utilizzate per le successive analisi multivariate. E' inoltre da mettere in evidenza che tra le 12 specie dominanti le prime 5 sono specie a selezione  $r$  con un contributo totale pari a circa il 51%. Sulla base della lista delle specie dominanti è stato calcolato un  $C/P$  index complessivo pari a 1. Proprio per la dominanza di specie a selezione  $r$ , valori di questo indice superiori o uguali a 1 indicano habitat meno stabili e meno adatti alla vita dei protozoi.

Il maggior numero di specie ( $S= 31$ ) è stato rinvenuto nel sito SIN5 che insieme al sito SIN8 registra anche le abbondanze maggiori ( $>5000$  ind. $\text{ml}^{-1}$  di percolato di suolo), a dispetto della maggior presenza di inquinanti organici ed inorganici. Il sito SIN4, al contrario, registra il minor numero di specie ( $S= 14$ ) e la minore abbondanza. Il punto SIN1 presenta i valori più elevati di  $H'$  (indice di diversità di Shannon-Wiener) e  $J$  (indice di equitabilità di Pielu) ed il punto SIN5 il valore maggiore di ricchezza di specie  $d$  (ricchezza di Margalef). Il punto SIN4 presenta i valori più bassi di  $H'$ ,  $d$  e  $J$ .

Al fine di identificare eventuali parametri abiotici maggiormente coinvolti nella strutturazione delle comunità di protozoi ciliati identificate, è stata applicata un'Analisi delle Corrispondenze Canoniche (CCA). Per l'analisi sono state utilizzate le matrici dei dati biotici relative alle abbondanza delle specie, previa trasformazione con radice quadrata e quelle relative ai parametri abiotici (chimico-fisici e contaminanti) previa trasformazione logaritmica e normalizzazione. Nel diagramma di ordinamento della CCA appare che le specie caratterizzanti i punti del sito sono principalmente

specie opportuniste a selezione *r*. L'analisi di CCA conferma, pertanto, la minore idoneità di tale sito per le comunità dei ciliati, denotando maggiori condizioni di instabilità.

Un'ulteriore analisi, la "Generalized Procrustes Analysis" (GPA) è stata successivamente effettuata per valutare il grado di accordo (consenso) tra le tre matrici di dati (biotici: abbondanze ciliati; abiotici: parametri chimico-fisici e contaminanti) e per identificare, inoltre, quale componente abiotica (parametri chimico-fisici, contaminanti) potesse, eventualmente, contribuire maggiormente (o egualmente partecipare) alla strutturazione delle comunità di protozoi ciliati nei punti del monitoraggio. L'*output* finale della GPA è una configurazione di consenso che viene ottenuta mediante un processo di trasformazione (es. rotazioni, traslazioni, ridimensionamenti) a partire dalle matrici di dati originali. La GPA indica che entrambe le componenti abiotiche (chimico-fisiche e contaminanti) contribuiscono in maniera sostanzialmente egualitaria alla strutturazione delle comunità dei protozoi ciliati nel sito. In sintesi, le variazioni rilevate nella composizione quali-quantitativa delle comunità dei ciliati sono correlate con entrambe le componenti abiotiche: parametri chimico-fisici (in particolare la tessitura) ed i contaminanti.

Dal punto di vista della comunità dei lombrichi l'area SIN ha mostrato alta variabilità di biomassa e densità. I punti in cui essi erano più abbondanti erano quelli posti in direzione sud (SIN1 e SIN2), mentre i punti con la minor abbondanza erano SIN4, SIN 3 e SIN7.

La struttura funzionale della comunità dei lombrichi per i siti SIN1 ed SIN2 (**Figura 2.3.3**) era altamente rappresentata dal gruppo endogeo (80%), mentre il restante 20% era equamente ripartito tra il gruppo anecico e quello epigeo. SIN5, SIN4 e SIN7 erano simili, ma la frazione di gruppo epigeo era bassa e sembrava rimpiazzare il gruppo anecico.

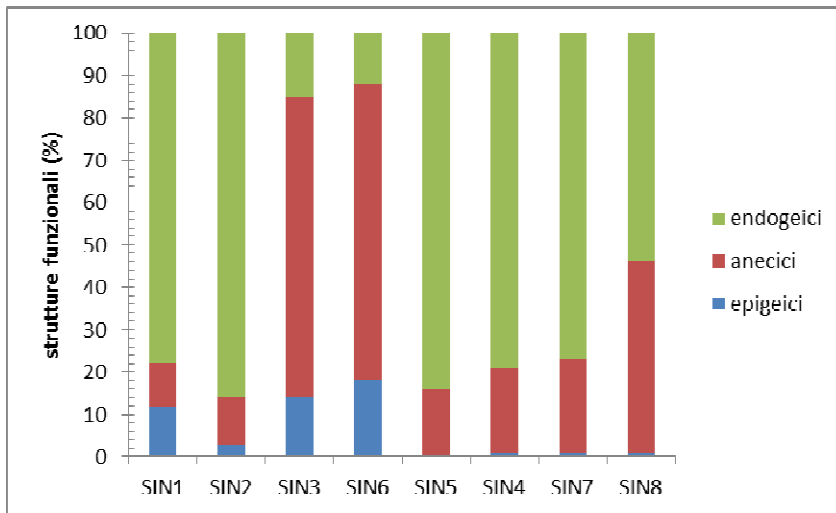
Le comunità in SIN6 e SIN3 erano simili (e molto differenti dagli altri punti), con bassa presenza del gruppo endogeo (<15%). Il sito SIN8 spicca con una ugual proporzione del gruppo endogeo ed anecico. Quindi, non può essere stabilita nessuna relazione tra la struttura funzionale delle comunità di lombrichi e la posizione relativa dei punti all'interno dell'area.

Nonostante i siti SIN1 ed SIN2 avessero una struttura funzionale simile e la posizione geografica fosse vicina, le strutture tassonomiche erano molto diverse. SIN1 era il sito dotato della maggior ricchezza di specie fra i siti SIN.

La struttura tassonomica dei siti SIN6 ed SIN8 era simile, mentre differivano altamente in termini di struttura funzionale, biomassa e densità.

La PCA condotta con le analisi del suolo ha discriminato il sito SIN8; questo può essere dovuto ad un insieme di metalli pesanti a concentrazioni elevate, specialmente per quanto riguarda il piombo.

L'arsenico era negativamente correlato con la densità delle specie *L. castaneus* LC e *Ap. meridionalis* NCM: qui la concentrazione dell'arsenico eccede i valori limite previsti dalla legge, sia il tabellare A che quello per i siti ad impiego industriale, tabellare B (D.Lgs. 152/2006), in S1, S2, S6 e S7. L'alta diversità del sito S1 ci fa capire che l'arsenico ha effetto sulla differenziazione dei taxa dei lombrichi.



**Figura 2.3.3. Composizione percentuale dei tre gruppi funzionali nell'area SIN**

L'area SIN corrisponde al sito maggiormente contaminato da metalli pesanti dell'intero progetto. Nonostante ciò, i parametri relativi alla comunità dei lombrichi (densità, biomassa e diversità), non hanno dato indicazione del livello di contaminazione. Tuttavia la variabilità della comunità nella zona era notevole in prossimità dei siti di campionamento.

Questa area può essere un esempio della capacità dei lombrichi di resistere alla contaminazione, come nel caso dell'arsenico: i nostri risultati dimostrano che i lombrichi sono ampiamente adattati alle sue alte concentrazioni, e che tale adattamento non è specifico di una specie. La densità e la diversità dei lombrichi può essere spiegata dalle condizioni di basso disturbo dovuto all'assenza di lavorazione dei suoli, che promuovono l'adattamento delle specie.

A partire dai risultati ottenuti dalla caratterizzazione dei parametri biologici descritti è stato possibile costruire dei grafici a radar mediante i quali avere una visione generale sullo stato di qualità e salute dei suoli campionati in questo sito. Accanto ai radar relativi ai parametri biologici abbiamo riportato anche quelli per la descrizione degli EPT e degli inquinanti organici. Nelle pagine seguenti vengono riportati i grafici radar di ogni punto campionato nell'area SIN.

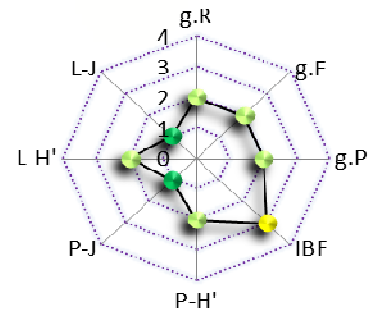
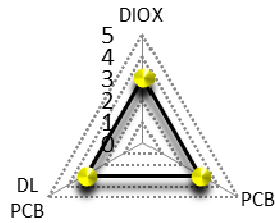
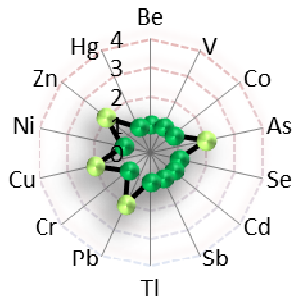
Nonostante le condizioni qualitative estreme in cui l'area versa a causa dell'elevata presenza di inquinanti, la salute del suolo non appare compromessa. Ovviamente occorre non sottovalutare qualche campanello di allarme relativo alla fertilità biologica ed alle attività enzimatiche di punti che però non sono quelli maggiormente colpiti dal punto di vista chimico.

EPT

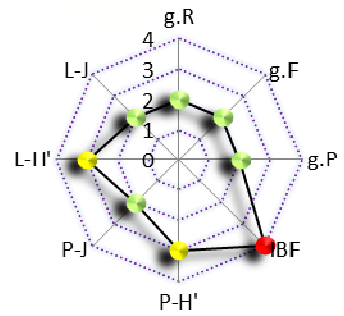
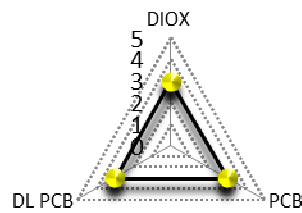
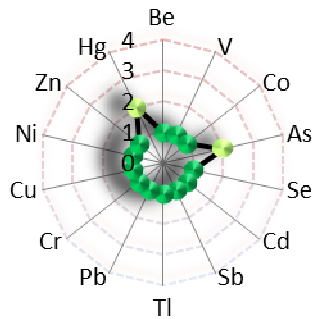
XENOBIOTICI ORGANICI

INDICATORI BIOLOGICI

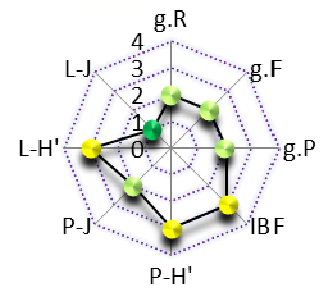
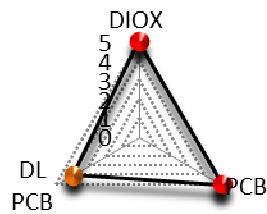
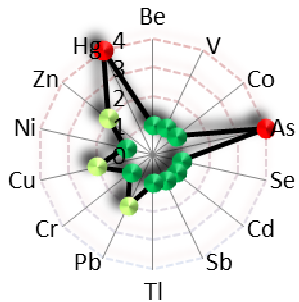
SIN1



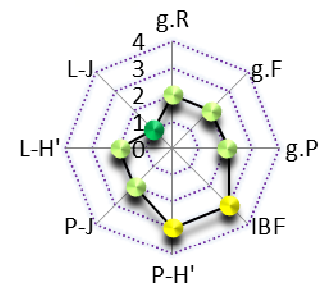
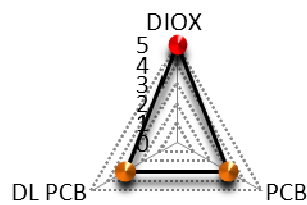
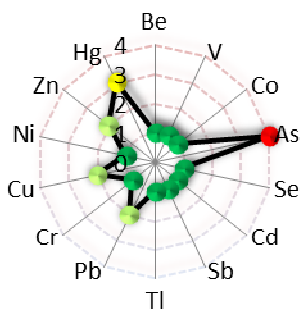
SIN2



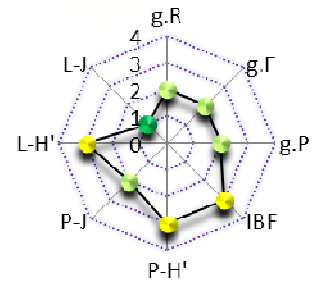
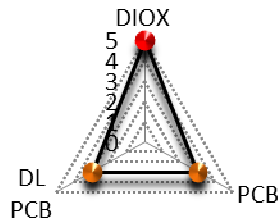
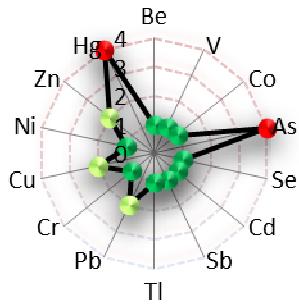
SIN3



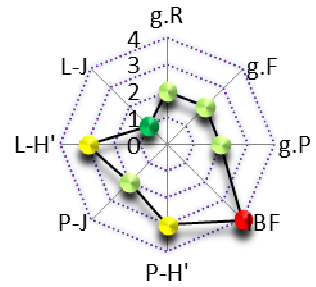
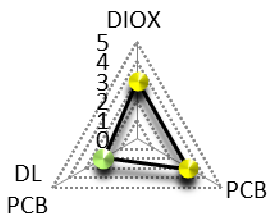
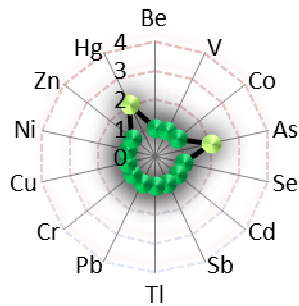
SIN4



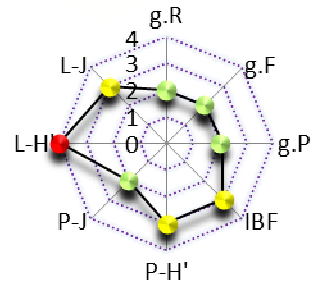
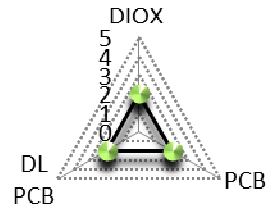
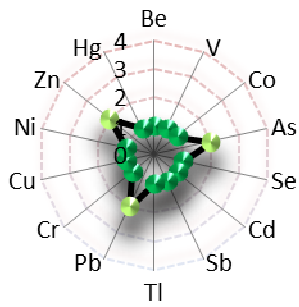
**SIN5**



**SIN6**



**SIN7**



**SIN8**

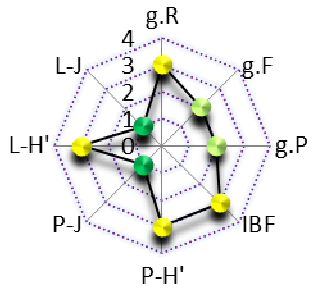
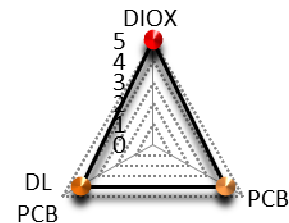
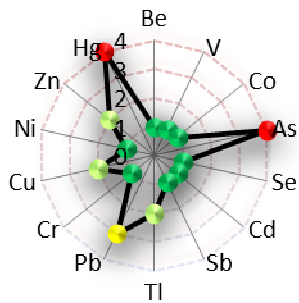
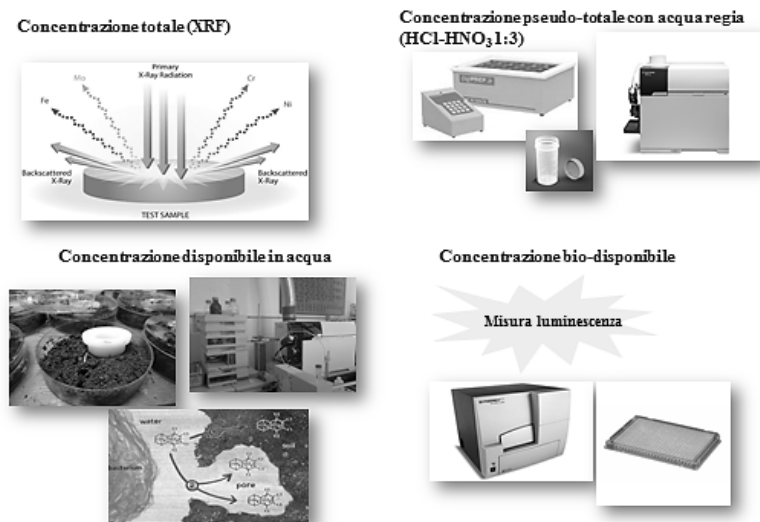


Figura 2.3.4. Grafici radar per la valutazione dei risultati ottenuti per tutti i parametri chimici, fisici e biologici indagati

## 2.4 Le tecniche bioanalitiche – applicazione di sensori bioluminescenti per valutare la biodisponibilità di arsenico e mercurio in un sito di interesse nazionale

Il Sito di Interesse Nazionale da noi preso in considerazione è stato sottoposto a svariate tecniche di indagine volte a raccogliere più informazioni possibili circa il suo stato generale ed il livello di contaminazione. Al di là della semplice quantificazione degli inquinanti e degli altri elementi indagati, ci siamo posti l'obiettivo di verificare la mobilità di due elementi in particolare: l'arsenico ed il mercurio. La **Figura 2.4.1** mette in evidenza le diverse analisi che si possono svolgere e le relative informazioni che ne scaturiscono. La mobilità degli elementi dal suolo verso gli altri comparti è un passo saliente che li rende potenzialmente accessibili agli organismi viventi.

Attraverso l'uso dei dispositivi DGT abbiamo finora stimato il quantitativo di arsenico (As) che dal suolo passa in soluzione. In questo paragrafo viene invece presentata l'applicazione di una tecnica bioanalitica che permette di valutare la bioaccessibilità dell'As e del mercurio (Hg) presenti nel sito, nel nostro caso nei confronti di batteri ingegnerizzati (*E. coli*).



**Figura 2.4.1.** Immagine esplicativa dell'insieme di analisi che si possono effettuare per determinare i diversi tipi di concentrazione di un elemento: totale, pseudo-totale, speciazione, frazione disponibile e bioaccessibile.

Si tratta dei biosaggi, tecniche bioanalitiche che sfruttano l'applicazione di organismi viventi o di parti di essi per quantificare uno specifico segnale che sia sintomo della presenza di sostanze inquinanti. Tra gli animali per esempio vengono usati lombrichi ed uccelli [10].

Gli organismi impiegati in questo tipo di analisi sono quindi dei veri e propri sensori. Nel nostro caso ci siamo serviti di un ceppo di *E. coli* (MC1061) ingegnerizzato per la produzione di luminescenza grazie alla presenza di due plasmidi (parsluxCDABE e pmerRluxCDABE) [11]. Il batterio è quindi in grado di produrre luminescenza con un'intensità proporzionale alla concentrazione del mercurio e dell'arsenico presenti in soluzione. Per monitorare la vitalità dei biosensori e considerare qualsiasi altro effetto avverso sulla produzione di luminescenza (per esempio un effetto background), abbiamo utilizzato un ceppo di *E. coli* pDNlux non ingegnerizzato in grado di produrre luminescenza in maniera costante ed indipendentemente. Un calo di emissione da parte di tale ceppo controllo può derivare dalla morte degli organismi a causa di concentrazioni troppo elevate degli inquinanti presenti in soluzione. Anche la risposta dei sensori è legata alla concentrazione dell'elemento per cui sono stati ingegnerizzati, ed è importante che tale legame sia

univoco, ovvero che la luminescenza prodotta derivi unicamente dall'analita di interesse. Nel nostro caso i ceppi utilizzati non vengono interferiti da altri elementi.

Altra questione importante è rappresentata dai limiti di rilevazione e quantificazione, ovvero quelle concentrazioni minime che sono rilevabili da parte dei sensori nel primo caso (limite di rivelazione), e che comportano una risposta quantificabile tramite emissione del segnale luminescente, nel secondo.

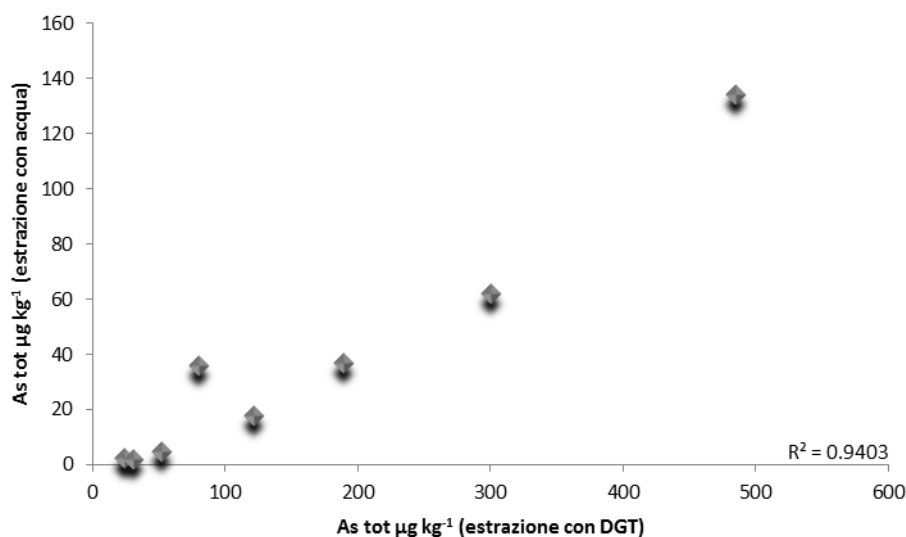
Come verrà poi spiegato dall'articolo proposto in questo capitolo, l'uso dei batteri bioluminescenti richiede innanzitutto un'estrazione fatta con acqua MilliQ. Per capire se i quantitativi degli elementi estraibili con acqua fossero sufficienti al funzionamento dei biosensori, abbiamo deciso di condurre una prova, analizzando successivamente le soluzioni risultanti mediante spettrometria di assorbimento atomico AMA per il mercurio e attraverso cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa HPLC-ICP-MS per l'arsenico totale e speciazione.

Le concentrazioni di mercurio rilevate nelle soluzioni (dati non presentati) sono risultate superiori al limite di quantificazione per i batteri bioluminescenti trovato in letteratura [13]. La *Tabella 2.4.1* mostra invece i risultati che si riferiscono alle diverse specie di arsenico ed al totale.

*Tabella 2.4.1. Speciazione dell'arsenico negli 8 campioni dell'area SIN e relativa percentuale estratta tramite slurry.*

	As(III) $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMA $\mu\text{g kg}^{-1}$	MMA $\mu\text{g kg}^{-1}$	As(V) $\mu\text{g kg}^{-1}$	tot $\mu\text{g kg}^{-1}$	% estrazione
SIN1	<0,04	<0,01	<0,03	2,32	2,29	0,06
SIN2	<0,04	<0,01	<0,03	17,8	17,8	0,30
SIN3	0,21	0,16	0,14	36	36	0,13
SIN4	0,10	0,08	0,10	62	62	0,23
SIN5	0,12	0,10	0,10	37	37	0,27
SIN6	0,25	0,07	0,08	4,6	4,5	0,10
SIN7	<0,04	<0,01	0,09	1,74	1,70	0,04
SIN8	0,22	0,05	0,06	134	134	0,45

Abbiamo inoltre avuto modo di verificare che le quantità totali di arsenico ricavate per mezzo di tali estrazioni sono ben correlate ai risultati ottenuti mediante l'applicazione dei dispositivi DGT, come mostrato in **Figura 2.4.2**.



**Figura 2.4.2. Correlazione tra arsenico estratto con acqua (slurry) e mediante uso dei DGT.**



# Application of luminescent bacterial biosensors for the determination of mercury and arsenic bioavailability in a contaminated area of Northern Italy

Laura Guidotti<sup>a</sup>, Vincenzo Puggioni<sup>b</sup>, Gian maria Beone<sup>a</sup>, Edoardo Puglisi<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale, UCSC, Italy

<sup>b</sup> Istituto di Entomologia e patologia vegetale, UCSC, Italy

<sup>c</sup> Istituto di Microbiologia, UCSC, Italy

**Abstract.** The aim of this work was to assess the bioavailability of mercury and arsenic in soil samples coming from a National Site of Interest of the North of Italy. Despite the high concentration of these two pollutants, over the limits imposed by the law, the use of a biosensor device like the microbial one, allows to determine the real risk that comes from such a situation. We operated a water extraction and constructed calibration curve with standard solutions, in order to quantify the amount of the two elements that pass into the solution, at different incubation times. In case of mercury we obtained a response that allowed to calculate the percentage of mercury that could be available for our bacterial strains.

## 1. Introduction

The presence of very high concentration of heavy metals and organic pollutants in soil and water may have several origins. The urbanization and the industrialization play a key role in this, especially in areas with very high density of population. On the other side the geology and pedogenesis determine the soil and water composition and background values of heavy metals, including the ones recognized as harmful for human health, like arsenic (As) and mercury (Hg). The introduction of threshold limits for the presence of heavy metals and organic compounds in environmental compartments is an important instrument to assess and limit the risk related to chemical contamination.

The Italian “Site of National Interest” (“SIN”) Brescia Agricola, near the city of Brescia, in the Lombardy Region (Northern Italy), is characterized by the presence of several organic compounds like PCBs and PCDD/F, and heavy metals (arsenic, mercury, zinc and lead). Thus any agricultural operation was prohibited, and the area was inserted in the list of “SIN” in 2003. The contamination affects both water and soil, and for what concerns heavy metal, the major presence is of mercury and arsenic. In the case of the mercury, the law imposes a limit of concentration of  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  in soil for private or public destinations, and  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  for industrial and commercial uses. The arsenic has higher limits than mercury:  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  for private or public destination and  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  for industrial and commercial uses [1].

From a global point of view the topsoil content of arsenic ranges from 0.1 to  $93 \text{ mg kg}^{-1}$  in the United States, from 4 to  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  in uncontaminated soils of Canada, between  $0.9\text{--}3.4 \text{ mg kg}^{-1}$  in Poland and from 2 to  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  in Bangladesh. Arsenic compounds and minerals are readily soluble, but their mobility can be limited by the sorption to clay component, hydroxides and organic matter. The oxidized state of the arsenic rules its speciation in soils. Arsenic is present as  $\text{As}^0$  and  $\text{As}^{3+}$  in reducing environments, with the latter being much more toxic and mobile than the  $\text{As}^{5+}$ . The anthropogenic sources of this element are: industrial activities like metal processing and chemical production based on P and S minerals, coal combustion, and the use of pesticides. It may derive also from irrigation waters and the fertilization with sludge [2].

Petersen et al. 1998 [3] defines mercury like “a global pollutant, and the US Clean Air Act Amendments, in 1990, have identified Hg as one of the trace elements listed in the legislation as “hazardous air pollutant” because of its toxicity, availability, potential bio-accumulation within the environmental compartments, and human health risk”.

The mercury average concentration in soil all over the world ranges between  $0.58$  and  $1.8 \text{ mg kg}^{-1}$ , being especially high in Cambisols and Histosols, of which the area under investigation is part. Mercury concentration in soils may be higher

especially near mining and smelting areas. The highest average concentration reported is  $0.4 \text{ mg kg}^{-1}$  in Canadian Histosols [2].

A typical soil characterization involves analytical techniques that allow to assess total and pseudototal metal concentrations. This is the case of the combination of the mineralization of a soil sample using acidic mixture (*aqua regia*) with the mass spectrometry (pseudototal arsenic determination), and the atomic absorption spectrometry (total mercury determination). Even if the limits imposed by the law are referred to the total (or pseudototal) concentration of an element, nowadays is becoming more and more important the concept of “availability” and “bioavailability”, in order to establish the real risk due to the presence of certain compound or elements.

The availability of an element depends on several environmental characteristics, like the pH, the organic matter content, the texture, but also on its speciation. So, a fraction of the total may be leached and reach water compartment. The bioavailable fraction is the soluble, ionic part that could interact with biota, being transported into living organisms [4].

In order to obtain information about the available and the bioavailable fraction of an element with respect on the total amount, we can conduct different sequential extraction procedures, or apply some analytical method based on the use of bioindicator systems [5], that enable to set the availability or bioavailability of the pollutants.

Bioindicators are “organelles, organisms or group of organisms suited to determine qualitatively or quantitatively the state of the environment” [6]. The biological methods used in the field of the environmental analysis belong to two main groups: bioanalytic and biomonitoring methods [7]. Biosensors, like microbial ones, are part of the bioanalytic methods. A biosensor it’s a device that allows to quantify the concentration of an analyte by the proportional production of a signal. The signal emission it’s due to the contemporary presence of a biological component and a physical transducer [8,9,10]. Luminescent bacteria are organisms able to emit luminescence in response to the presence of a particular element or compound.

With regard on the environmental field microbial biosensors found their major application. In this work luminescent bacteria were applied to assess the bioavailability of mercury and arsenic in soil samples from the Italian “SIN” area. Specific recombinant luminescent *Escherichia coli* MC1061 (pmerRluxCDABE) and *Escherichia coli* MC1061 (parsluxCDABE) respond to this two elements [11] The *lux* gene causes the production of luciferase in a dose-dependent way. This expression can be controlled in a constitutive or in a inducible way [10].

## 2. Materials and methods

### Soil samples and sampled area

The collection of the soil samples followed a pattern with a grid with meshes of 200 m; the whole area was approximately  $7 \text{ km}^2$  (Figure 1). The choice of the sampling points was based on the aim of covering and representing as much as possible the contaminated area. Each point was georeferenced following the WGS84 system (World Geodetic System 1984), and a sampling document with several environmental information was been compiled. These information regard: name of the sample, altitude, coordinates, photos and a description of the context. For the collection of each sample, operators constructed a square of 20X20 meters, subdivided in 25 4x4 meters subunit. 15 of these were been sampled as core of soils with a diameters of 2,6 cm and a depth of 30 cm. The 15 subsamples were been homogenized to obtain a sample for the laboratory analysis.

Coarse materials and crop residues were been separated on field [12].

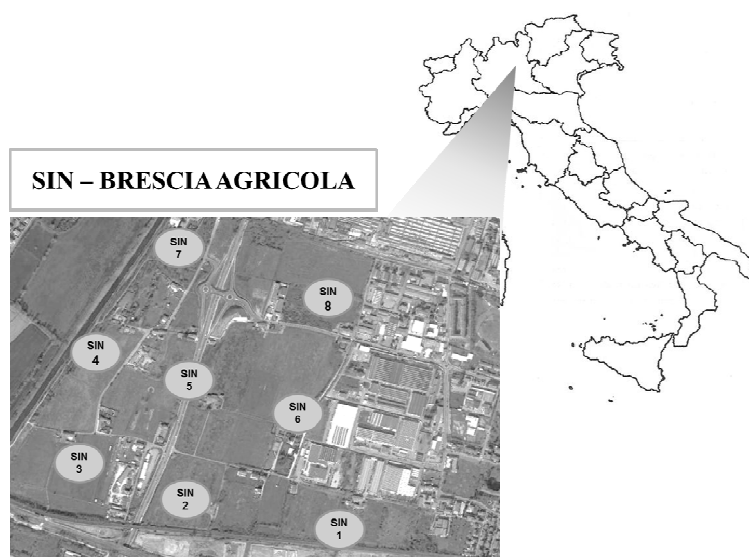


Figure 1: sampling points location in the SIN area

### Soil preparation and analysis

Soil samples were been air dried at 40°C until they reached the weight stability. Then they were mechanically disaggregated and sieved to 2 mm.

For the bio-analysis soil samples were mixed with 18 MΩcm MilliQ ultra-pure deionized water in a ratio soil:water of 1:9. We obtained a soil-water suspension by swirling each sample with vortex for one minute (slurry) [13].

We verified the concentration of arsenic, mercury and cadmium by centrifuging the suspensions and analyzing by ICP-MS (As and Cd), and AMA (Hg). Then we performed the arsenic speciation by HPLC-ICP-MS (HPLC 1100 Agilent Technologies, Tokyo, Japan), with a PRP-X100 Anion Exchange column (Hamilton), and a mobile phase constituted of 66% of 80mM ortophosphoric acid (85%, Carlo Erba) (pH=6 obtained with NH<sub>3</sub> 30% v/v), 32% of methanol and 2% of H<sub>2</sub>O (MilliQ). We investigated the presence of four species: As(III) and (V) (inorganic), and MMA, DMA (organic).

The pseudo-total concentration of arsenic was been determined by *aqua regia* digestion with a DIGIPREP graphite block, and ICP-MS Agilent 7900 (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). For the digestion (120 min, 95°C) we weighted 0.5 g of soil and we added 2.5 mL of HNO<sub>3</sub> (63% Sigma, suprapur) and 7.5 mL of HCl (37% Sigma, suprapur).

The total concentration of mercury was been performed by atomic absorption spectrometry AMA, weighting 0.1g of soil in a vessel made of nichel.

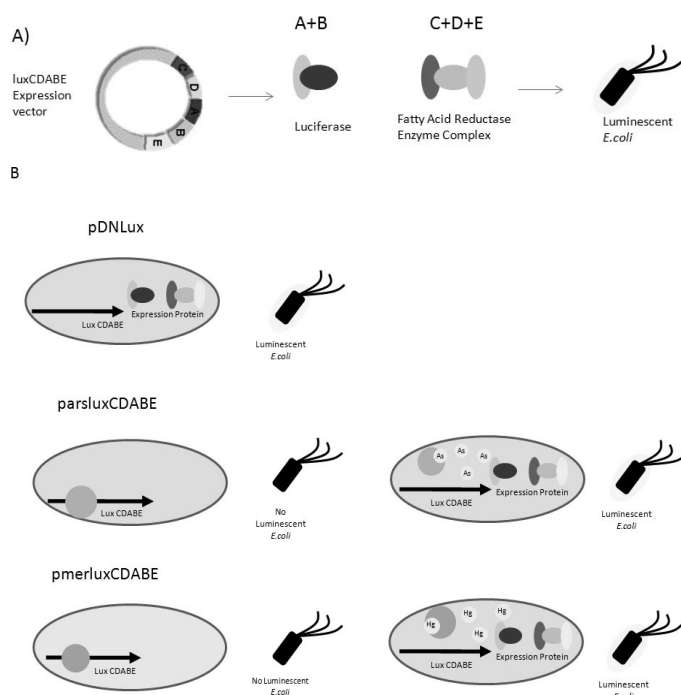
### Bacterial strains

The recombinant sensors used in our work were been constituted of the bacterium *E.coli* MC1061 as the host, carrying two different plasmids for arsenic and mercury: *parluxCDABE* and *pmerRluxCDABE* [11].

In order to consider any adverse effect on the luminescence of the bacteria, due for example to the turbidity of the solutions, and to the toxicity of the metal concentration, we select the luminescent recombinant *E.coli* MC1061 (pDNlux) that is not inducible by heavy metals because it doesn't contain metal-sensing elements, as a control strain.

The bio-sensors used were transformed with a plasmid coding bacterial lux operon (Figure 2A).

The As-sensor had the *parluxCDABE* plasmid, and the Hg-sensor had the *pmerRluxCDABE*. The genes of the bacterial luciferase operon *luxCDABE* coming from the terrestrial *Photobacterium luminescens* (terrestrial), used as reporter genes, avoid the use of the substrate luciferine to produce luminescence. The operon lux transcription was controlled from different promoter in different plasmids: a arsenic element response in the plasmid pArslux CDABAE, a mercury element response in the plasmid pMerRCDABAE lux and T7 promoter in the pDNlux. In the first and second plasmids the specific repressor (*arsR* or *merR*) blocked the transcription and the consequent light emission in absence of inductor, in the third plasmid there is a constitutive expression of lux operon (Figure 2B) The luminescence of As-sensor is induced only by arsenic, both As(III) (arsenite) and As(V) (arsenate), but with different limit of quantification [15]. The concentration of cadmium in soil-water suspension was verified by centrifuging it and analyzing with ICP-MS Each sample had a concentration of cadmium lower than the one of mercury, as recommended in [15, 18].



**Figure 2** A) The plasmid is for expression of: luciferase(AB) and Fatty Acid Reductase Enzyme Complex(CDB). The substrates of this enzymes are reduced flavin mononucleotide (FMNH<sub>2</sub>), molecular oxygen, and long chain fatty aldehyde. All of them is available in *E.coli*. The excess energy, which is liberated from the oxidation of FMNH<sub>2</sub> and aldehyde concomitant with the reduction of molecular oxygen, is released as blue/green light emission.

B) In pDNlux T7 promoter control the transcription. T7 is a strong constitutive promoter. The bacteria transformed with this plasmid is able to emit always light.

In pArsCDABE the promoter is blocked form the repressor *arsR*. Only in presence of As (III or V) the repressor was removed from response element and there is the transcription of lux operon and the consequent light emission. The intensity of light emission is directly proportional of As concentration.

In pMerRCDABE the promoter is blocked form the repressor *merR*. Only in presence of Hg the repressor was removed from response element and there is the transcription of lux operon and the consequent light emission. The intensity of light emission is directly proportional of Hg concentration.

### **Standard preparation**

We started from a standard solution of 1 g L<sup>-1</sup> of As(V) and we diluted with water to obtain standard of 10 mg kg<sup>-1</sup>, 80 µg kg<sup>-1</sup>, 100 µg kg<sup>-1</sup>, 150 µg kg<sup>-1</sup>, 200 µg kg<sup>-1</sup>, 250 µg kg<sup>-1</sup>, 300 µg kg<sup>-1</sup>. We started from a minimum concentration of 80 µg kg<sup>-1</sup> because Ivask et al. 2007 indicated it as the limit of the quantification for As(V) for this biosensor (80 ±1.6 µg kg<sup>-1</sup>). In case of mercury the LOQ found in this article was 0.030±0.001 µg kg<sup>-1</sup>. We started from a standard solution of HgCl 1000 mg kg<sup>-1</sup> and we diluted with water to obtain standard of 1 mg kg<sup>-1</sup>, 1 µg kg<sup>-1</sup>, 2 µg kg<sup>-1</sup>, 5 µg kg<sup>-1</sup>, 10 µg kg<sup>-1</sup>, 15 µg kg<sup>-1</sup>, 20 µg kg<sup>-1</sup>.

### **Growth and cell preparation**

The bacteria were taken from a stock frozen at -70°C and grown on *Luria Broth* (LB) (1,5% of agar (w/v)) agar plates with ampicillin 100 µg ml<sup>-1</sup>, overnight at 37°C [14].

Sensor bacteria then were grown on M9 minimal medium (Difco™ Minimal Salt, 5X), and ampicillin, being continuously shaken overnight at 37°C. When they reached the exponential phase (OD<sub>600</sub>=0.6), they were diluted with the same medium until OD<sub>600</sub> ~0.1, and they were ready for the experiment.

### **Test protocol**

For the experiment we used white 96-well plates (Corning®) (polystyrene, TC-treated, clear flat bottom wells, sterile, w/lid, white), in which we put 100 µL of bacterial suspension and 100 µl of MilliQ water (as the blanc), or standard solutions, or samples

All the measurement were conducted in triplicate. The background luminescence was determined using MilliQ water instead of samples and standard, in six replicates, both for control and sensor strains.

The plates were incubate at a temperature of 30°C, and the luminescence was measured after 1, 2, 3, 4, 19 and 26 hours, instead of only one measurement at 2 hours as indicated in Ivask et al., 2007.

The luminescence was measured with a Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTeck).

### **Data elaboration**

The response of the sensor bacteria was normalized with the luminescence obtained for the water. The induction was thus calculated as:

$$\text{Induction} = \frac{L_s}{L_b}$$

The induction was than corrected using the correction factor CF obtained from the control bacterium:

$$\text{CF} = \frac{L_b}{L_s}$$

where L<sub>b</sub> is the luminescence obtained from the water, and L<sub>s</sub> the luminescence obtained for the samples and standards [15].

We have determined also the percentage of inhibition of the luminescence, using the following formula [14]:

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{L_b - L_s}{L_b} 100$$

The limit of detection of the normalized luminescence (LOD<sub>NL</sub>) was calculated as:

$$\text{LOD}_{\text{NL}} = \frac{x_b + 3SD}{x_b}$$

where x<sub>b</sub> is the mean background luminescence value of the sensor and SD the standard deviation.

## **3. Results and discussion**

Working on the assessment of the risk and the bioavailability of heavy metals and other pollutants in a contaminated area, we must consider soil type, most of all clay and organic matter content.

As the experiment were performed using soil-water suspension of the samples (slurry), the bacteria were exposed both to dissolved metals and to the ones bound to the particles of soil, that may become bioavailable [15]. Tiina Petänen 2001 [16], working with slurry samples to assess the mercury bioavailability, demonstrated that the bacteria used as sensor were capable to release heavy metal ions from clay particles, but not from humus samples. In order to well appreciate the response and establish if the extraction of the two elements was time dependent, we choose to perform the measurement of the luminescence at different incubation times.

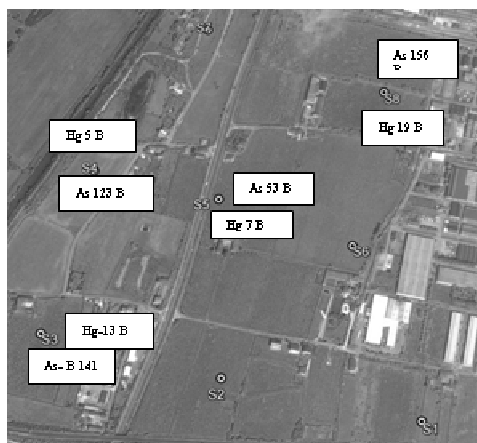
Prior to conduce this work, we have characterized the area under study. The soil has an high content of organic matter, but looking to the high carbon-nitrogen ratio, it seems to be not well stabilized and humified. Clay content it's around 10% of the texture composition, and the pH of soil it's between 7.5 and 8.0 (data not shown). This, together with the cation exchange capacity, could reduce the heavy metals mobility.

For the arsenic we found a maximum concentration 3 times over the limit of  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ . In this case we have to consider that in north of Italy this element is naturally present in soil and water, because of the geology. Average concentration here is  $70 \text{ mg kg}^{-1}$ , while in those parts of the region with the same pedological characteristics, the background is around  $23\text{-}30 \text{ mg kg}^{-1}$ , that is however over the A limit of the law ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Table1).

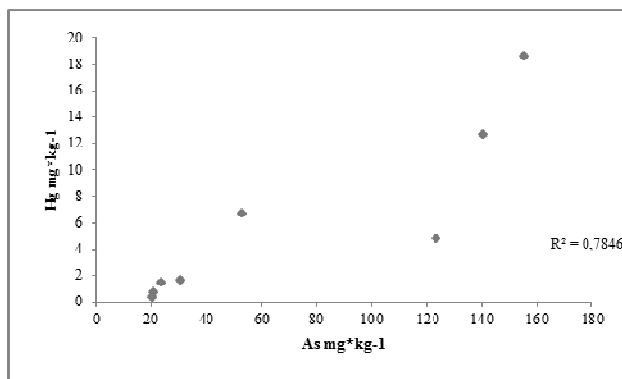
The Figure 3 shows the levels of arsenic and mercury found in the SIN area, but only the ones that were upper the higher limit of law. From the dislocation of the most contaminated points it seems that there was a preferential direction of the diffusion of the pollutants. The plot shows the correlation between As and Hg.

The speciation analysis on samples revealed only the inorganic As(V), and for this reason we constructed the calibration curve only for this species.

Mercury has an average concentration of  $6 \text{ mg kg}^{-1}$ , while in the rest of the Region the background concentration is about  $0.19 \text{ mg kg}^{-1}$ . The highest concentration found in this area was about  $19 \text{ mg kg}^{-1}$ .



a)



b)

Figure 3: a) diffusion of the pollutants in the sampled area SIN, where the concentration of mercury and arsenic were over the highest limit of law; b) correlation between arsenic and mercury concentration (AMA and ICP-MS).

Table1: determination of the slurry concentrations of mercury and arsenic, after centrifugation, to compare with the biosensors LOD (As(V):  $80 \pm 1.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; Hg:  $0.03 \pm 1.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Ivask et al., 2007)

	As (aqua regia) ICP-MS ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	As (slurry) ICP-MS ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Hg (tot) AMA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Hg (slurry) AMA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
S1	21000	11.8	710	3.52
S2	30000	90	1640	4.16
S3	141000	176	12600	5.06
S4	123000	289	4800	4.17
S5	53000	141	6700	4.72
S6	24000	22	1470	4.12
S7	21000	8.2	390	3.47
S8	156000	700	18600	3.7

## Analysis of bioavailable As and Hg

### Control strain for As

After 2 hours of incubation, the mortality of the control bacteria for the lowest concentration standard ( $80 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was 2%, while the most concentrated standard solution ( $300 \mu\text{g L}^{-1}$ ) caused 18% of the mortality.

After the first hour of incubation the mortality was lower, while after three hours it seems that there is no more mortality. The percentage of inhibition of luminescence is always below zero, that probably indicates a background influence.

Considering the slurry (samples), we can note a decrease of the light that is measured by the luminometer, probably due to the turbidity and the presence of particles of soil. For this reason the percentage of the inhibition of the luminescence of the slurry is very high, even from the first hour of incubation. The values are almost between 50% and 90%.

The CF factor calculated as showed before is then used to correct the results of the sensor bacteria (Figure 4).

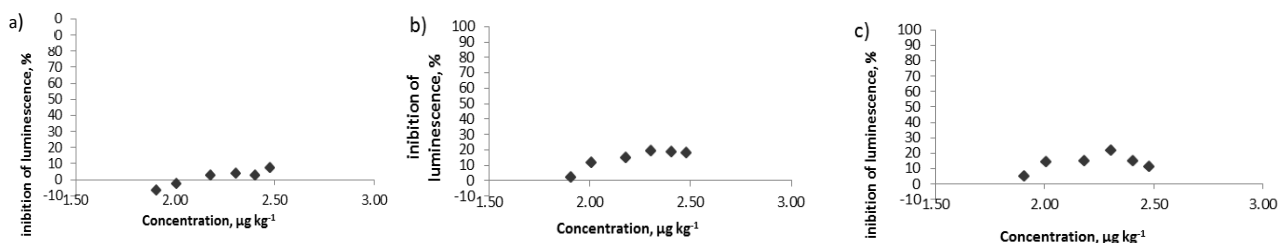


Figure 4: percentage of luminescence inhibition of the control strain a) after one hour of incubation; b) after two hours and c) after three hours.

### As-sensor

Unfortunately the normalized values of luminescence obtained for the calibration curve do not reached satisfactory levels (Figure 5). After the first hour of incubation they were under the LOD, and the same was for the third, fourth, nineteenth and twenty-sixth hour. Only after 2 hours of incubation we obtained a response, but the values of normalized luminescence were very similar to each other, even if there was a difference in the concentration of the calibration curve ( $80, 100, 150, 200, 250$  and  $300 \mu\text{g L}^{-1}$ ). This means that the range of concentration that we used basing on the results obtained from the previous characterization of samples, and considering also the LOD for As(V) found in literature ( $80 \mu\text{g L}^{-1}$ , Ivask et al. 2007 [15]), is too low for this kind of sensor.

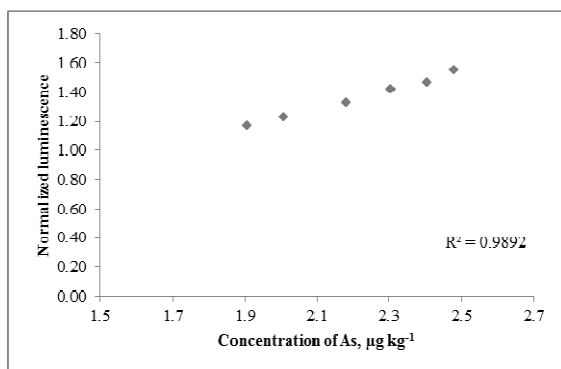


Figure 5: calibration curve for the As-sensor response

Basing on this we cannot use the obtained equation to quantify the response of the sensor bacteria for the samples.

## Analysis of bioavailable mercury

### Control strain

After two hours of incubation the mortality of the control bacteria for the less concentrated standard solution ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was 0%, while for the higher ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was 22%.

After one hour of incubation the percentage of mortality was between 0% and 16%. Starting from the third hour the mortality became to be higher from the first standard, and also the uncertainty start to rise.

For the slurry we can note the same effect of decrease of the luminescence, due to the turbidity of the samples. As in the case of the arsenic, the percentage of inhibition is between 50% and 90%. The calculation of the CF factor allows to consider this phenomenon and to correct the results when considering the Hg- sensor bacteria.

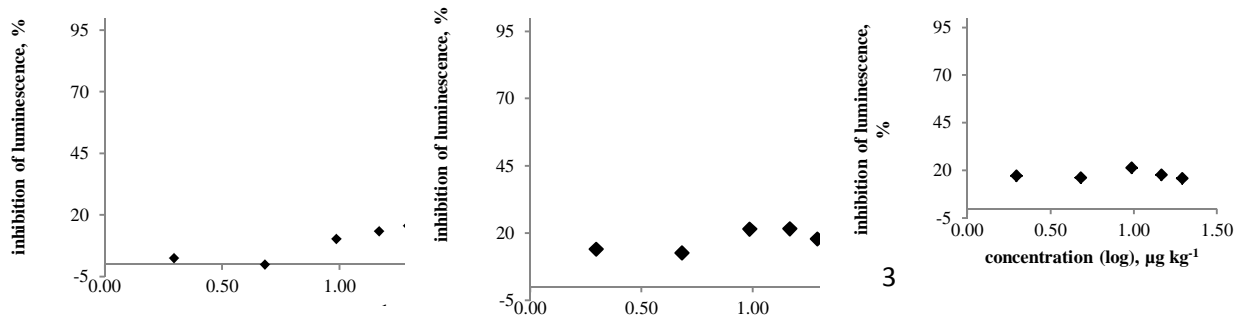


Figure 6: Percentage of luminescence inhibition of the control strain a) after one hour of incubation; b) after two hours and c) after three hours.

**Hg-sensor**

After two hours of incubation, we obtained a calibration curve with a correlation coefficient  $R^2$  equal to 0.97. Using the resulting equation and the values of the normalized luminescence, we obtained the concentration of mercury for each sample, shown in Table 2. 7 samples out of 8 induced a quantifying response of the sensor. After the third hour of incubation all the samples can be quantify, and also in this case the calibration curve has a  $R^2$  equal to 0.97 (Figure 7).

There is a good correlation between total mercury in soils (AMA  $\text{mg kg}^{-1}$ ) and its concentration in the slurry (Figure 7). This seems to mean that the greater is the quantity of mercury in soil, the more this could pass into the water becoming available and potentially bio-available.

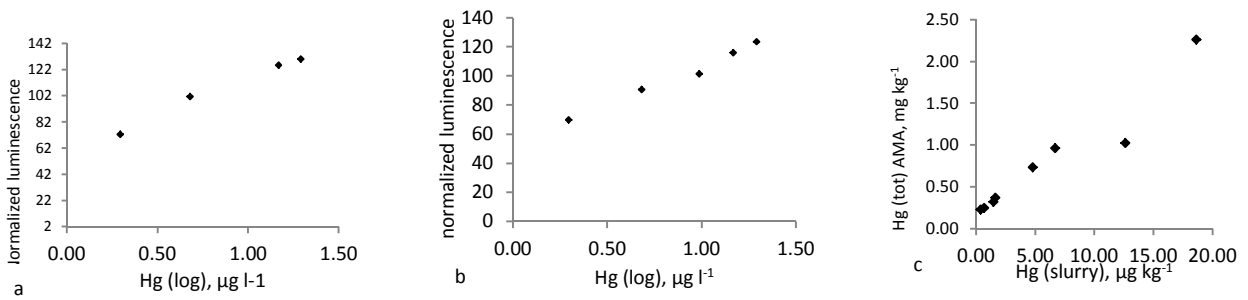


Figure 7: calibration curve for Hg-sensor response at a) 2 hours of incubation and b) 3 hours of incubation; c) correlation between Hg total concentration in samples and the one deriving from the biosensor response.

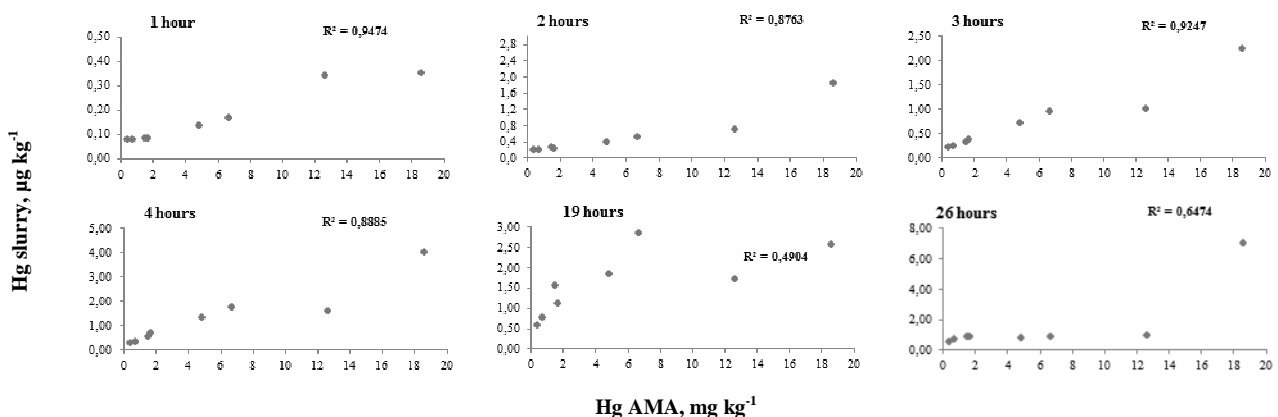


Figure 8: correlation between total mercury in soil samples and the slurry concentration after different incubation times.

The quantification of the induction of luminescence at different incubation times, shows that there is an increment of induction for the first four hours. The slope of the curve of the induction is greater in proportion to the total mercury content in the soil (Figure 8).

Considering the control strain, the mortality of the bacteria after the third hour it's significant, and so the best compromise probably it's to consider only the first three measurement (Figure 9).

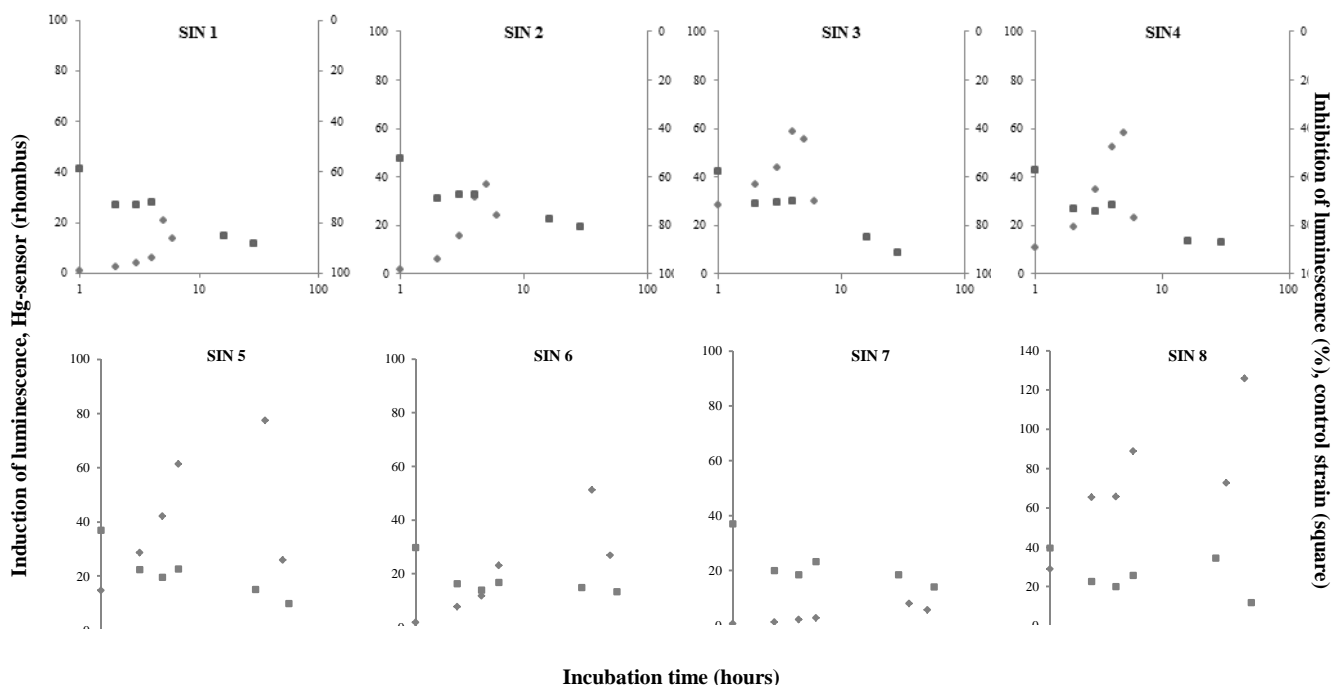


Figure 9: induction of luminescence after 1, 2, 3, 4, 19 and 26 hours of incubation of the inducible strain (blue) and inhibition of luminescence in the control strain (red), for each sample

Furthermore looking at the trend of the induction of luminescence for each sample at the different hours, we can note that this faces the distribution of total concentrations found with the AMA instrument. From the 19<sup>th</sup> hour this is not more respected (Figure 10).

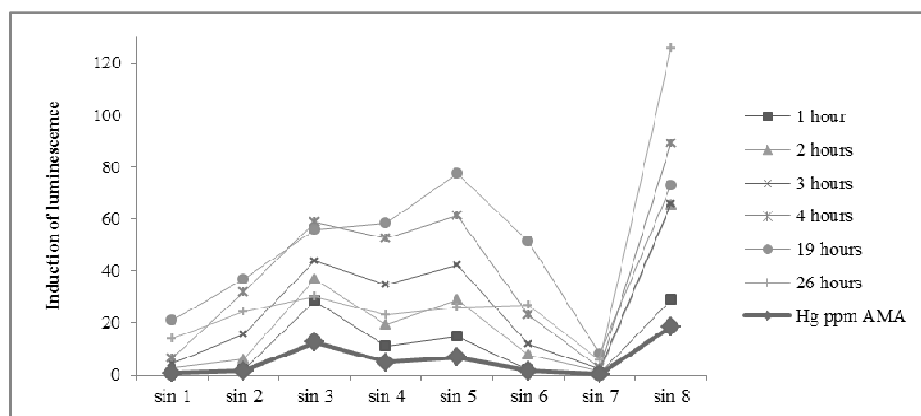


Figure 10: proportional induction of luminescence at different incubation times for each sample

The bioavailable fraction of mercury determined by the bacteria range between 0.05% and 0.57% of the total concentration. A. Ivask et al. 2007 [14] obtained data a little bit higher, ranging from 1.2% and 6.7%, while Petänen and Romantschuk, 2003 [14] obtained a percentage of 0.27%. This probably depends on soil composition in terms of texture, pH, etc.

The threshold value imposed by the law for the mercury concentration in groundwater is  $1\mu L^{-1}$ , so we are over this limit (Table 2).



Table 2: mercury concentrations found with the Hg-biosensor, after 2 and 3 hours of incubation, compared with the results of the AMA analysis.

	AMA $\mu\text{g kg}^{-1}$	slurry, ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (2 hours)	% of the total	slurry, ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (3 hours)	% of the total
sin 1	710	2.11	0.3	2.39	0.34
sin 2	1640	2.49	0.15	3.59	0.22
sin 3	12600	6.29	0.05	10.01	0.08
sin 4	4800	3.85	0.08	7.18	0.15
sin 5	6700	5.19	0.08	9.42	0.14
sin 6	1470	2.66	0.18	3.13	0.21
sin 7	390	< 0.20	/	2.21	0.57
sin 8	18600	19.13	0.1	22.2	0.12

#### 4. Conclusions

In this work we wanted to test biosensor recombinant bacteria to assess the risk due to the abundant presence of mercury and arsenic in a “Site of Natural Interest” in northern Italy.

These biosensors were constituted of *E.coli* MC1061 as the host, and two plasmids (parsluxCDABE and pmerRluxCDABE) for the luminescence induction. Prior to do this, we characterized the site from a chemical point of view and we found the presence of the As(V) as the only arsenic form; we have established the range of its concentration in order to construct the calibration curve, but these values did not allowed to appreciate a luminescence response. For the mercury we obtained a signal for our samples, and we estimated the percentage of bioavailable mercury. Furthermore we have tested different incubation times, in order to evaluate if the emission of luminescence (related to the mercury concentration) was time dependent. We can conclude that in our case three hours of incubation are the best choice to reach a quantification.

#### References

- [1] Decreto Legislativo 3 aprile 2006 n°152, “Norme in materia ambientale”, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96;
- [2] Alina Kabata-Pendias, “Trace elements in soils and plants” . 4th ed. © 2011 by Taylor and Francis Group, LLC;
- [3] Petersen G, Munthe J, Pleijel K, Bloxam R, Vinod Kumar A. A comprehensive eulerian modeling framework for airborne mercury species development and testing of the tropospheric chemistry module (TCM). “*Atmospheric Environment*”, 1998, Vol 32, n.5, p.829-843;
- [4] Rensing C, Maier RM. Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability, “*Ecotoxicology and Environmental Safety*”, 2003, n. 56 p.140–147;
- [5] Peltola P, Ivask A, Åström M, Virta M. Lead and Cu in contaminated urban soils: Extraction with chemical reagents and bioluminescent bacteria and yeast, “*Science of the Total Environment*, 2005, n. 350 , p.194-203;
- [6] Fränzele O. Complex bioindication and environmental stress assessment, “*Ecological Indicators*”, 2006, n.6, p.114–136;
- [7] Gadzała-Kopciuch R, Berecka B, Bartoszewicz J, Buszewski B. Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitoring, “*Polish Journal of Environmental Studies*”, 2004, Vol. 13, n. 5 .p. 453-462;
- [8] D’Souza SF. Review Microbial biosensors, “*Biosensors & Bioelectronics*”, 2001, n.16p.337-353;
- [9] Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants, “*Current Opinion in Microbiology*”, 2003, n.6, p.206-212;
- [10] Liang Sua, Wenzhao Jia, Changjun Houb, Yu Leia, “Microbial biosensors: A review”, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 1788–1799;
- [11] Hakkila K, Maksimow M, Karp M, Virta M. Reporter Genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors, “*Analytical Biochemistry*”, 2002, n.301 , p.235-242 ;
- [12] Cenci RM (2008) Guidelines for the use of native mosses, transplanted mosses and soils in assessing organic and inorganic contaminant fallout. EUR 23292 EN. ISBN 978-92-79-08719-6. ISSN 1018-5593. 35 pp;
- [13] Ivask A, Virta M, Anne Kahru A. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil, “*Soil biology & Biochemistry*”, 2002, n.34, p.1439-1447;
- [14] Ivask A, Rõlova T, Kahru A, A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing, “*BMC Biotechnology*”, 2009, n.9, p.41;

- [15] Ivask A, Green T, Polyak B, Mor A, Kahru A, Virta M, Robert Marks R. Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain, "*Biosensors and Bioelectronics*", 2007, n.22,p. 1396–1402;
- [16] Petänen T. "Assessment of Bioavailable Concentrations and Toxicity of Arsenite and Mercury in Contaminated Soils and Sediments by Bacterial Biosensors" Academic Dissertation, Faculty of Science Department of Biosciences Division of General Microbiology University of Helsinki, 2001;
- [17] Lund PA, Ford SJ, Brown NL. Transcriptional Regulation of the Mercury-resistance Genes of Transposon Tn501, "*Journal of General Microbiology*", 1986, n.132, p. 465-480;
- [18] Tauriainen SM, Virta M, Karp MT. Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria, "*Water Research*" 2000, Vol. 34, n.10, pp. 2661-2666

## **2.5 Conclusioni**

L'area oggetto di indagine è stata dichiarata nel 2003 "Sito di Interesse Nazionale", ed in base a ciò tutte le attività in questa zona sono state proibite. La criticità deriva dalla presenza di diossine, furani, pesticidi ed elementi quali metalli e metalloidi in generale. Viste le particolari problematiche di interesse ambientale di un sito sottoposto a questo tipo di tutela, abbiamo deciso di farlo rientrare nel nostro progetto di monitoraggio, per determinarne la qualità dei suoli anche attraverso l'uso di indicatori biologici e di altre tecniche innovative. Lo scopo era quello di approfondire la conoscenza del contesto superando la semplice informazione costituita dalla concentrazione totale e pseudo-totale dei contaminanti, cercando di stabilire il reale pericolo che può derivare dalla presenza di determinate sostanze.

Dopo aver determinato il contenuto (totale e pseudo totale) di diversi elementi ed aver fatto il confronto con i limiti imposti dal Decreto Legislativo 152 del 2006, norme in materia ambientale, abbiamo constatato la presenza ingente di arsenico, mercurio, piombo, zinco e rame, con sforamenti che riguardano anche il limite di legge meno restrittivo (tabellare B), che concerne i siti destinati ad uso industriale. A questo punto abbiamo proceduto con la determinazione delle frazioni disponibili di mercurio ed arsenico, applicando un'estrazione solido-liquido con acqua MilliQ, per verificare la possibilità di procedere con le analisi che implicavano l'uso dei biosensori luminescenti.

Per quanto riguarda l'arsenico abbiamo altresì impiegato degli innovativi dispositivi, i DGT. I risultati ottenuti con entrambe le tecniche di estrazione si sono dimostrati correlati, e hanno evidenziato che la gran parte dell'arsenico presente nei campioni è costituito da As(V), forma fortunatamente meno tossica di quella con stato di ossidazione (III). I DGT hanno evidenziato che la quantità di arsenico che è in grado di passare nel comparto acquoso supera il limite previsto dal D. Lgs. 152/06 per le acque sotterranee, pari a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , uguale a quello previsto per lo stesso elemento dal D.Lgs. n° 31 del 02/02/2001, per le acque potabili, in 5 su 8 campioni. Tuttavia la percentuale di arsenico in questione non supera mai l'1% della concentrazione in cui esso è presente nei terreni.

Per quanto riguarda la caratterizzazione mediante l'uso dei batteri luminescenti non è stato invece possibile ottenere una risposta.

Per il mercurio, le estrazioni preventive hanno sottolineato che esso è in grado di passare nel comparto acquoso con concentrazioni che sfiorano ampiamente il relativo limite per le acque sotterranee pari a  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Il D.Lgs. n° 31 del 02/02/2001 riguardante sostanze alimentari quali bevande, acqua potabile e destinata al consumo umano stabilisce lo stesso limite di concentrazione per il mercurio. Le percentuali che potenzialmente passano in acqua stimate con tale metodo di estrazione oscillavano tra lo 0,05% e lo 0,57% rispetto al totale. I dati da noi trovati sono inferiori a quelli determinati da Ivask et al. nel 2007[11], i quali trovarono percentuali di biodisponibilità per il mercurio comprese tra 1,2% e 6,7%. Essi a loro volta avevano confrontato i loro risultati con quelli pubblicati da Petänen e Romantschuk nel 2003 [12], osservando che questi ultimi avevano ottenuto percentuali inferiori (0,27%) a prova del fatto che la biodisponibilità è strettamente legata e determinata dalle caratteristiche del suolo contestuale.

Per quanto concerne il mercurio abbiamo potuto ottenere una risposta dall'applicazione dei biosensori che si è rivelata correlata alla maggiore o minore presenza dell'elemento negli estratti. Tale risposta è risultata dipendente dal tempo di incubazione dei batteri posti a contatto con le soluzioni estratte dai terreni, avendo testato diverse modalità. La conclusione che possiamo trarre è che 3 ore di incubazione permettono di apprezzare una risposta di luminescenza che ci ha consentito di quantificare tutti ed otto i campioni. Le concentrazioni così ricavate sono al di sopra del limite di  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

In base a quanto appurato mediante le diverse analisi condotte possiamo affermare che nel Sito di Interesse Nazionale in questione esiste un potenziale rischio per la salute derivante dalla mobilità degli inquinanti presenti. Nonostante ciò, da uno sguardo ai risultati ottenuti attraverso l'uso degli indicatori biologici possiamo affermare che la funzionalità ecosistemica non risulta compromessa.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] Società Italiana della Scienza del Suolo: *Metodi normalizzati di analisi del suolo*. Edagricole, Bologna, 1985;
- [2] Decreto Legislativo 3 aprile 2006 n°152, Norme in materia ambientale;
- [3] Kabata-Pendias A: *Trace elements in soils and plants*. 4th ed. © 2011 by Taylor and Francis Group, LLC;
- [4] Cornelis R. Handbook of Elemental Speciation. Techniques and Methodology. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England;
- [5] IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, supplement 6, Genetic and Related Effects: An Updating of Selected IARC Monographs from Volumes 1 to 42, 1987; 729 pages;
- [6] Zhang H and William Davison W. *In situ* speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. "Pure and Applied Chemistry", 2001, Vol. 73, n.1, p. 9–15;
- [7] Harper MP, Davison W, Zhang H, Tych W: Kinetics of metal exchange between solids and solutions in sediments and soils interpreted from DGT measured fluxes. "Geochimica et Cosmochimica Acta", 1998, vol. 62, n.16, p.2757–2770;
- [8] Fontanella MC, Beone GM, Cattani I. Determination of arsenic species using the Diffusive Gradients in Thin films (DGT) device. In Understanding the Geological and Medical Interface of Arsenic, As 2012 - 4th International Congress: Arsenic in the Environment, Taylor & Francis, The 4th International Congress on Arsenic in the Environment, Cairns Australia, 22-27 luglio 2012, 402-403, 2012;
- [9] Österlund H, Faarinen M, Ingri J and Baxter DC. Contribution of organic arsenic species to total arsenic measurements using ferrihydrite-backed diffusive gradients in thin films (DGT). "Environmental Chemistry", 2012, 9(1), p. 55-62;
- [10] Hofman J, Bezchlebová J, Dušek L, Doležal L, Holoubek I, Anděl P, Ansorgová A, Malý S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. "Environment International", 2003, n.28, p.771-778;
- [11] Fränzle O: Complex bioindication and environmental stress assessment, "Ecological Indicators", 2006, n.6, p.114–136;
- [12] Hakkila K, Maksimow M, Karp M, Virta M: Reporter Genes *luxFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors, "Analytical Biochemistry", 2002, n.301, p. 235-242;
- [13] Ivask A, Green T, Polyak B, Mor A, Kahru A, Virta M, Marks R. Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain, "Biosensors and Bioelectronics", 2007, n.22, p.1396–1402;
- [14] Petänen T, Romantschuk M. Use of bioluminescent bacterial sensors as an alternative method for measuring heavy metals in soil extracts. "Analytica Chimica Acta", 2002, n. 456, p. 55–61;
- [15] Huang JH, Fecher P, Ilgen G, Hu KN, Yang J. Speciation of arsenite and arsenate in rice grain – Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey. "Food Chemistry", 2012, n. 130, p. 453–459;
- [16] Huang JH, Ilgen G, Fecher P. Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. "Journal of Analytical Atomic Spectrometry", 2010, n. 25, p 800–802;
- [17] Fontanella MC. Application of different techniques for arsenic determination in human food chain: *from groundwater to dining table*. Tesi di Dottorato, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, 2013;
- [18] Zhang H, Davison W, Gadi R, Kobayashi T. In situ measurement of dissolved phosphorus in natural waters using DGT. "Analytica Chimica Acta", 1998, n.370, p 29-38.

**CAPITOLO 3: APPLICAZIONE DELLA DILUIZIONE ISOTOPICA ALLA  
SPETTROMETRIA DI MASSA PER LA QUANTIFICAZIONE DEL CROMO  
ESAVALENTE IN CAMPIONI DI SUOLO DI UN'AREA UBICATA NEL NORD  
ITALIA**

**3.1 Caratterizzazione chimico-fisica dell'area**

La motivazione per cui l'area in questione è stata inserita fra le sette zone da noi considerate è la diffusione in passato di cromo esavalente (Cr(VI)) all'interno delle acque di falda. L'area ha un'estensione di circa 5 km in direzione est-ovest, circa 9 km in direzione nord-sud, e comprende 5 comuni. Il campionamento ha previsto la raccolta di quattordici campioni di suolo.

La diffusione delle acque contaminate è partita in entrambi i casi da nord e si è diretta verso sud, interessando l'intera area da noi considerata. Le analisi effettuate sui campioni di acqua prelevati dai pozzi hanno rivelato livelli di concentrazione di Cr(VI) allarmanti. Il limite tabellare di contaminazione previsto dal Decreto Legislativo 152/2006 [1] è pari a  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , mentre nella zona in questione le concentrazioni rilevate arrivavano a  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ . Queste sono le motivazioni che ci hanno spinti a verificare la presenza di tale elemento anche nei terreni adiacenti, destinati all'attività agricola. Il limite previsto per la presenza di cromo esavalente nei suoli è pari a  $2 \text{mg kg}^{-1}$  nel caso di terreni destinati a verde pubblico, privato e residenziale, e pari a  $15 \text{mg kg}^{-1}$  per siti ad uso commerciale e industriale [1].

La **Figura 3.1.1** illustra il territorio sottoposto ad indagine. I punti campionati sono situati nelle immediate vicinanze dei paesi presenti nell'area, in tutte e 4 le direzioni cardinali. Le destinazioni d'uso dei terreni sono due: coltivazione di mais (CR1, CR4, CR7, CR8, CR10 e CR11), e prato (CR2, CR3, CR5, CR6, CR9, CR12, CR13 e CR14).

*Tabella 3.1.1. Elenco dei parametri chimico-fisici analizzati nell'area*

<b>Analisi chimico-fisiche</b>	
◦	<i>pH</i>
◦	<i>Tessitura</i>
◦	<i>Capacità di Scambio Cationico</i>
◦	<i>C tot, organico e N</i>
◦	<i>C inorganico</i>
◦	<i>Macroelementi (Fe, Ti, Al, Si, Ca, K, P, Mg, Na )</i>
◦	<i>EPT (As, Cd, Co, Mo, Sb, Se, Sn, Tl, V, Zn, Pb, Cr, Cu, Mn, Ni)</i>
◦	<i>Hg</i>
◦	<i>Diossine, PCBs, PCB diossino-simili, agrofarmaci organoclorurati, ritardanti di fiamma</i>

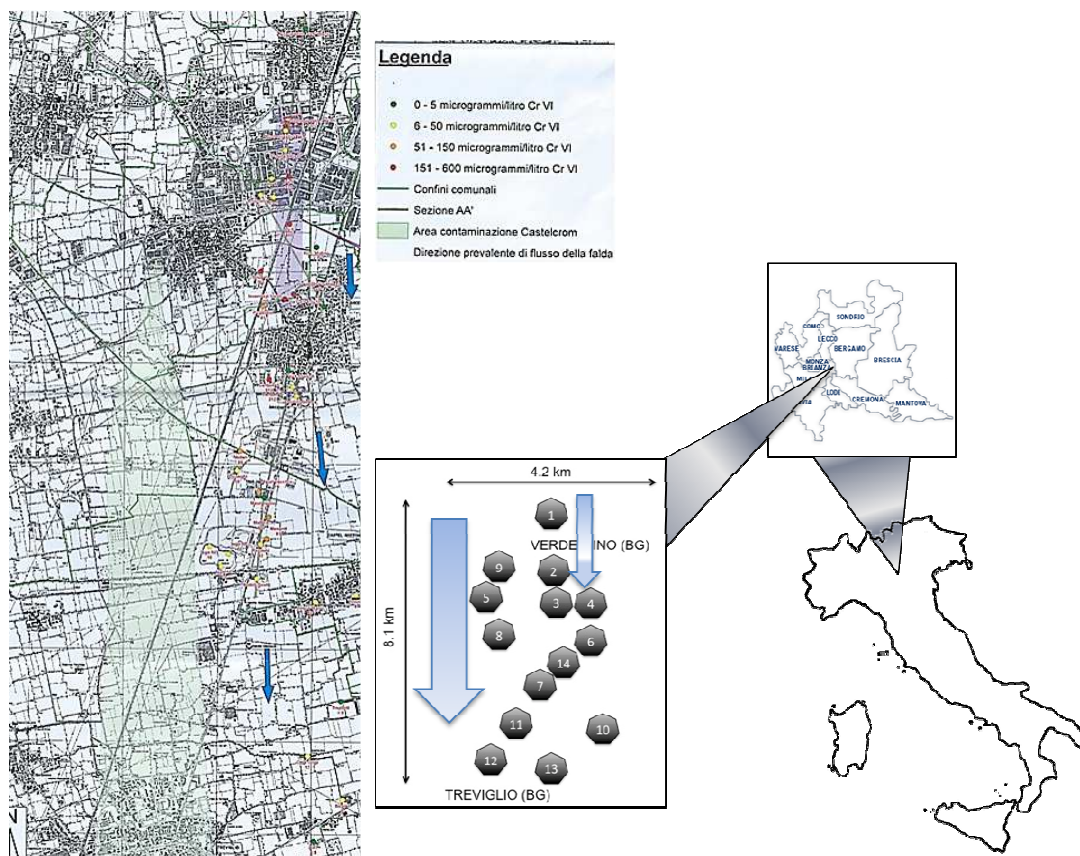


Figura 3.1.1. Mappa di diffusione del cromo esavalente nelle acque sotterranee (sinistra) e disposizione dei punti di campionamento (destra).

Tabella 3.1.2. Parametri chimico-fisici ed agronomici dell'area indagata

	N %	C %	Calcare %	C inorganico %	C organico %	C/N	SO %	pH	Sabbia %	Limo %	Argilla %	CSC (meq 100g <sup>-1</sup> )
CR 1	0,12	1,16	<0,20	<0,02	1,16	9,70	2,00	7,1	27,4	65,8	6,8	15,4
CR 2	0,20	2,20	0,97	0,12	2,1	10,17	3,59	7,5	47,2	43,4	9,4	19,7
CR 3	0,17	1,55	<0,20	<0,02	1,55	9,29	2,67	7,0	50,0	41,9	8,1	20,3
CR 4	0,14	1,16	<0,20	<0,02	1,16	8,49	1,99	6,2	15,4	70,7	13,8	15,1
CR 5	0,32	2,65	<0,20	<0,02	2,6	8,31	4,57	7,4	50,7	43,7	5,6	24,6
CR 6	0,32	2,61	<0,20	<0,02	2,6	8,23	4,51	6,3	34,2	57,2	8,6	23,8
CR 7	0,20	1,64	<0,20	<0,02	1,64	8,40	2,83	7,0	27,7	58,3	14,0	20,5
CR 8	0,30	2,45	<0,20	<0,02	2,5	8,06	4,23	7,1	42,3	45,3	12,4	11,0
CR 9	0,19	1,65	<0,20	<0,02	1,65	8,54	2,84	6,8	40,9	43,3	15,8	16,2
CR 10	0,22	1,81	<0,20	<0,02	1,81	8,06	3,12	7,1	20,3	57,9	21,7	21,7
CR 11	0,20	1,94	<0,20	<0,02	1,94	9,63	3,35	7,7	31,4	47,0	21,6	18,7
CR 12	0,23	1,70	<0,20	<0,02	1,70	7,45	2,93	6,6	44,9	47,7	7,4	19,3
CR 13	0,17	1,41	<0,20	<0,02	1,41	8,22	2,43	7,2	37,8	49,3	13,0	17,7
CR 14	0,14	1,14	<0,20	<0,02	1,14	8,32	1,96	6,6	25,3	51,3	23,5	17,6

La Tabella 3.1.2 illustra i dati relativi alle diverse analisi di caratterizzazione chimico-fisica svolte. I terreni di questa zona ricadono nella categoria dei Luvisols. Il pH, considerando anche l'estensione di tale area, è abbastanza variabile (valori compresi fra 6.2 e 7.7). I terreni dell'area presa in considerazione sono classificabili in subacidi (CR4, CR6, CR14 e CR12), subalcalini (CR2, CR5 e CR11) e neutri.

Il limo è presente con valori oscillanti tra il 43 e il 66% e rappresenta la componente maggiormente presente mentre l'argilla assume valori tra il 5.6 e il 23.5%. Il tenore in sostanza organica varia tra l'1,96% ed il 4,6%, con una media pari al 3,07%. Dato tale valore e vista la percentuale di argilla, la zona è mediamente dotata di una quantità soddisfacente di sostanza organica. Il rapporto C/N è però in media leggermente inferiore al 9, ed è compreso tra il 7.5 ed il 10.2. Nella maggior parte dei casi è circa pari a 8. Questo indica una tendenza alla mineralizzazione della sostanza organica. I valori della Capacità di Scambio Cationico ricadono fra la fascia media e alta.

Per quanto riguarda i macroelementi la *Tabella 3.1.3* riporta le percentuali medie ottenute dall'analisi XRF.

*Tabella 3.1.3. Percentuali dei macroelementi ricavati mediante analisi XRF*

	Na %	Mg %	Al %	Si %	P %	K %	Ca %	Ti %	Fe %
CR1	0,6	0,95	7,81	30,7	0,09	2,07	0,56	0,62	3,07
CR2	0,52	1,19	8,15	26,2	0,1	2,58	1,67	0,57	3,91
CR3	0,41	0,75	6,89	29,7	0,08	1,72	0,64	0,56	3,26
CR4	0,46	0,68	6,68	30,9	0,09	1,77	0,42	0,62	3,04
CR5	0,48	1,09	7,34	27,1	0,13	2,38	0,73	0,49	3,79
CR6	0,47	0,77	7,32	30,6	0,08	1,89	0,74	0,65	3,31
CR7	0,36	0,7	6,56	30,4	0,16	1,77	0,51	0,56	3,41
CR8	0,51	1,09	8,04	28,1	0,14	2,55	0,53	0,42	3,88
CR9	0,48	1,17	8,08	27,6	0,11	2,63	0,49	0,5	3,81
CR10	0,38	0,78	7,11	31,8	0,14	1,92	0,56	0,61	3,54
CR11	0,48	1,45	8,23	27,2	0,13	2,42	1,31	0,48	4,21
CR12	0,52	1,23	8,33	28,3	0,1	2,54	0,49	0,54	3,87
CR13	0,39	0,81	7,27	32,1	0,12	1,85	0,39	0,57	3,48
CR14	0,37	0,7	6,89	31,1	0,08	1,74	0,39	0,54	3,34

Dal punto di vista del fosforo l'area risulta esserne scarsamente dotata-povera mentre per il potassio i valori ne indicano una dotazione ricca.

Per quanto riguarda gli Elementi Potenzialmente Tossici (*Tabella 3.1.4*), sei di essi hanno superato il limite A del D.Lgs. 152/2006. Uno di questi è lo stagno, che come ormai noto, supera quasi sempre il limite di  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , presentando una concentrazione media di  $2,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , rientrante nel valore pari al 95° percentile ricavato dai dati relativi alla fase generale ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Gli altri superamenti riguardano soprattutto l'arsenico, il piombo, il rame e lo zinco.

Anche nel caso dell'arsenico abbiamo già avuto modo di appurare che in diverse zone della regione lombarda esso supera il limite tabellare A di  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  [1], per questioni geologiche. 6 punti su 14 mostrano un superamento di tale soglia, che oscilla tra i 21 ed i  $25 \text{ mg kg}^{-1}$ . I punti in questione si trovano nella fascia occidentale dell'area, ovvero quella più adiacente ai primi rilievi montuosi ed anche all'altra area riccamente dotata di arsenico, costituita dai Cambisols settentrionali, dove il 95° percentile trovato in fase generale era pari a  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ . Tale valore nel caso dei Luvisols è inferiore, essendo pari a  $23 \text{ mg kg}^{-1}$ . Lo zinco presenta un valore limite A di  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  [1]. I superamenti hanno riguardato i punti CR2, CR5, CR7 e CR8. Il 1 superamento riscontrato nel punto CR 2 è però ben più significativo degli altri, essendo pari a  $739 \text{ mg kg}^{-1}$ , mentre per gli altri tre il valore più alto era di  $213 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Gli altri superamenti (piombo e rame) riguardano un solo punto dell'area campionata, il CR2. I valori che questi elementi assumono in tale punto, oltre a superare il limite tabellare A, sono molto diversi dai valori riscontrati nel resto dell'area campionata, che si rivelano sempre piuttosto omogenei. Questa discrepanza è stata analizzata attraverso la costruzione di boxplot. Da tale elaborazione abbiamo ottenuto che nel caso di molibdeno, cadmio, antimONIO, piombo, rame, nichel, zinco, mercurio e stagno, il punto CR2 assume valori ritenuti outlier. Questo rivela una differenza sostanziale fra il punto in questione ed il resto dell'area, differenza che non si evince invece dal punto di vista strutturale

(pH, tessitura ect.). Da uno sguardo alle schede di campionamento il punto sembra ricadere in un'area con presenza di capannoni e magazzini che fanno pensare ad un'area industriale (Figura 3.1.2).



Figura 3.1.2. Area di raccolta dei campioni di suolo

Da uno sguardo ai valori rilevati in fase generale per i Luvisols, l'area mostra concentrazioni medie sono in linea con il contesto, esclusi i valori associati al punto CR2.

Tabella 3.1.4. Valori relativi agli EPT indagati (\*D.Lgs. 152/06).

mg kg <sup>-1</sup>	Be	V	Co	As	*	Se	Cd	*	Sb	Tl	Pb	*	Cr	Cr (VI)	*	Cu	*	Ni	Zn	*	Hg
CR 1	0,74	31	9,9	15,1		0,69	0,40		1,51	0,48	50		34	0,23		24		20	120		0,12
CR 2	0,96	39	12,5	23	A	0,81	2,2	A	4,09	0,68	136	A	45	0,64		519	A	107	739	A	0,60
CR 3	0,86	34	16,0	13,2		0,94	0,40		1,22	0,33	44		32	0,24		36		29	101		0,14
CR 4	0,80	36	13,7	13,3		0,79	0,48		1,22	0,48	44		35	0,3		27		24	123		0,13
CR 5	1,00	39	9,0	23	A	0,84	0,64		2,73	0,49	64		25	0,25		28		22	163	A	0,19
CR 6	0,82	38	9,1	15,4		1,05	0,60		1,50	0,53	64		39	0,33		25		22	144		0,15
CR 7	0,87	36	15,7	13,9		0,93	0,60		1,45	0,39	47		59	1,38		81		40	182	A	0,14
CR 8	1,10	41	10,2	27	A	0,91	0,71		3,22	0,54	74		61	2,4	A	44		24	217	A	0,21
CR 9	1,03	43	10,2	24	A	0,81	0,46		2,63	0,45	54		28	0,48		27		23	124		0,22
CR 10	0,99	38	19,3	13,3		1,02	0,57		1,23	0,28	40		87	1,25		48		37	116		0,11
CR 11	1,08	38	11,2	21	A	0,90	0,41		1,95	0,41	45		30	0,25		34		28	124		0,14
CR 12	0,91	33	10,1	25	A	0,72	0,30		2,48	0,34	40		26	0,55		28		22	102		0,11
CR 13	0,92	35	13,8	15,3		0,93	0,32		1,55	0,34	47		32	0,49		39		28	96		0,11
CR 14	0,96	36	15,5	13,9		0,93	0,45		1,38	0,33	50		38	0,51		45		35	100		0,14

Tabella 3.1.5. Concentrazioni degli inquinanti organici nell'area

	diossine I-TEQ (ng kg <sup>-1</sup> )	PCB (ng g <sup>-1</sup> )	DL-PCB WHO <sub>05</sub> -TEQ (ng kg <sup>-1</sup> )	DDT (ng g <sup>-1</sup> )	BFR (ng g <sup>-1</sup> )
CR1	1,83	34	4	0,5	3
CR2	28	30	3,5	4,9	12
CR3	2,3	3,6	0,57	0,42	6,4
CR4	1,33	3,1	0,35	0,21	6
CR5	3	6,5	1	0,72	9,3
CR6	2,1	4,4	0,56	0,78	12,7
CR7	1,65	10,7	0,78	0,5	19
CR8	4,4	9,7	1,04	3,04	71
CR9	2	3,7	0,49	0,4	3,9
CR10	2,7	5,3	0,49	4,3	113
CR11	3	5	0,67	0,96	2,4
CR12	1,4	1,7	0,38	0,51	2,8
CR13	3,1	3,7	0,43	0,95	9,6
CR14	1,5	5,1	0,51	0,56	2,6
A*	10	60	10	10	////
B*	100	5000	100	2000	////



Da uno sguardo alla *Tabella 3.1.5* è possibile notare che un solo punto campionato supera i limiti previsti dal D.Lgs. 152/06 per gli inquinanti organici considerati: si tratta del sito CR2 in riferimento alla concentrazione di diossina. In generale il punto CR2 mostra anche in questo caso i valori più elevati dell'area, per tutti gli analiti tranne che per i ritardanti di fiamma. Quest'ultima categoria è apparsa piuttosto elevata in tutta l'area, rispetto ai valori rilevati nella regione Lombardia. Per i DDT CR2, CR10 e CR8 le concentrazioni riscontrate si discostano da quelle ottenute nel resto dell'area.

Per quanto riguarda il problema principale di quest' area, ovvero la diffusione di acque contaminate da cromo esavalente, si è voluto verificare se questa avesse determinato superamenti dei limiti di legge anche nei terreni. Il cromo esavalente manifesta la sua maggior pericolosità in caso di inalazione. La presenza di tale elemento potrebbe quindi rappresentare una fonte di pericolo per la salute degli operatori agricoli durante lo svolgimento di alcune pratiche come l'aratura. Il D.Lgs. 152/06 impone come limiti  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  (A) e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (B).

### **3.2 Il cromo esavalente**

Il cromo può assumere stati di ossidazione che variano da +6 a -2, anche se in natura esso si trova praticamente in soli due di essi: +3 e +6. In natura il cromo esavalente può esistere sotto forma di specie diverse a seconda del pH del sistema: a pH che oscilla tra 6.5 e 14 la specie predominante è il cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ); al di sotto di 6.5 e fino a valori di pH pari a 0.7 si ha la presenza di bicromato ( $\text{HCrO}_4^-$ ) e dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ). Il cromato ed il bicromato sono ioni monomerici che conferiscono all'acqua una tipica colorazione gialla, quando la concentrazione del Cr(VI) supera  $1 \text{ mg L}^{-1}$  [2,3].

La specie in cui il cromo si presenta condiziona la sua mobilità, e di conseguenza anche la sua disponibilità. Esso può formare diversi composti con un ampio range di solubilità, fra i quali quelli derivanti dall'associazione con piombo, calcio e bario sono i più insolubili, mentre i dicromati passano facilmente nella soluzione acquosa del suolo [3].

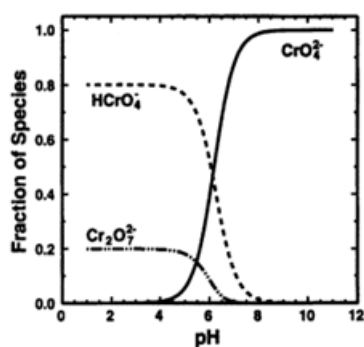


Figura 19. Distribuzione delle specie di Cr(VI) in funzione del pH [2]

L'importanza di rilevare la presenza di Cr(VI) sia nelle acque che nei suoli dipende dalle sue caratteristiche di tossicità e perché il suo stato di ossidazione lo rende cancerogeno [4,5].

La pericolosità del cromo esavalente potenzialmente presente in un suolo può esplicitarsi attraverso tre meccanismi: inalazione, ingestione e contatto [4,5,6]. Alcune pratiche di gestione dei terreni agricoli potrebbero infatti comportare l'entrata in contatto con il cromo esavalente durante operazioni come l'aratura, che provoca la sospensione in aria di particelle di terreno. Laddove vi sia una quantità sufficiente di tale elemento, l'impatto sulla salute potrebbe essere grave. Diversi studi, come raccolto ed illustrato nella review prodotta da Dayan e Paine nel 2001[5], hanno dimostrato

che l'esposizione eccessiva al Cr(VI) comporta l'esplicitarsi di tre tipi di tossicità: irritazione, cancerogenicità (e tossicità genetica) e allergenicità.

Il contatto con il cromo esavalente comporta ulcerazioni croniche alla pelle e dermatiti, mentre l'inalazione causa irritazioni marcate del tratto respiratorio; questa è anche la via attraverso la quale il Cr(VI) manifesta la propria cancerogenicità. Altre malattie legate all'inalazione sono riniti, broncospasmi, polmoniti ed asma bronchiale. L'ingestione può causare invece la necrosi del fegato e dei reni. La dose orale letale per gli adulti è di 50-70 mg di cromati solubili per kg di peso corporeo [4,5].

Il primo studio epidemiologico riguardante il cromo esavalente fu condotto nel 1948 da Machle e Gregorius [6], coinvolgendo lavoratori del settore della produzione dei cromati negli Stati Uniti, da cui risultò che il 21.8% delle morti in questo settore industriale erano dovute al cancro del sistema respiratorio. Cinquant'anni dopo, nel 1990, in occasione del centenario della comparsa del primo caso di cancro ai polmoni in Scozia, Langard S. pubblicò una review allo scopo di portare in evidenza l'importanza che lo stato di ossidazione del cromo riveste, concludendo che tutti i composti del cromo esavalente dovessero essere considerati cancerogeni per la popolazione esposta [7].

Per quanto riguarda la tossicità genetica, prove condotte su cellule umane in vitro e su cellule animali in vivo, hanno dimostrato che diversi composti a differente solubilità in acqua inducono danni al DNA, mutazioni genetiche, aberrazioni cromosomiche ed altre patologie. Si tratta di cromati e dicromati di ammonio, sodio, potassio, e cromati di stronzio e calcio [4,5].

Per i motivi esposti la Commissione Europea ha deliberato ed imposto dei limiti al suo rilascio nell'ambiente, azione che ha comportato la necessità di possedere dei metodi standardizzati che consentano la sua determinazione nelle varie matrici ambientali.

Come precedentemente accennato i campioni oggetto del nostro studio sono suoli provenienti da un'area agricola. Di conseguenza potrebbe esistere il rischio di inalazione da parte degli operatori agricoli durante lo svolgimento delle loro attività. Il nostro obiettivo era quindi quello di verificare la presenza e la concentrazione di tale elemento prelevando dei campioni di terreno ad una profondità massima di trenta cm, spessore interessato dalle lavorazioni.

Per determinare la concentrazione di un elemento in una matrice come il suolo occorre innanzitutto operare un'estrazione, dopo aver accuratamente preparato il campione. Nel caso specifico occorre estrarre solo il cromo avente stato di ossidazione pari a +6, con l'obiettivo di fornire un dato finale rappresentativo del campione di partenza. Come facilmente intuibile, questo dettaglio è alla base della buona riuscita dell'analisi.

Il problema principale della quantificazione del cromo esavalente è legato proprio a questo passaggio: durante l'estrazione infatti si verificano delle reazioni di interconversione fra le due principali forme di cromo, Cr(III) e Cr(VI), causate dalla presenza di agenti ossidanti e riducenti che vengono estratti assieme al cromo, e dalle condizioni di pH usate.

Esistono diversi metodi per la quantificazione del cromo esavalente, sviluppati nel corso degli anni, molti dei quali implicavano l'uso della difenilcarbazide (DPC). Nel 1977 il National Institute for Occupational Safety and Health propose il primo metodo per la quantificazione del Cr(VI) nel particolato atmosferico degli ambienti di lavoro nel settore siderurgico [8].

Anche il protocollo USEPA proposto attraverso il metodo 3060 nel 1984 e successivamente modificato nel 1996 (3060A), prevedeva l'uso di DPC per la separazione delle specie di cromo estratte mediante una soluzione alcalina (pH 12) costituita da  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH ed un buffer fosfato [9]. Queste condizioni erano adatte all'estrazione di tutte le forme solubili ed insolubili di Cr(VI) da campioni di suolo, fanghi, sedimenti e tutti i materiali di rifiuto ad essi assimilabili.

Questa modalità di estrazione permetteva di minimizzare le interconversioni fra Cr(III) e Cr(VI), eccetto in presenza di elevate concentrazioni di manganese [3].

Pettine e Capri nel 2008 misero in luce un problema legato alla contemporanea presenza della DPC e condizioni alcaline come quelle previste dal metodo USEPA; in queste modalità, infatti, il rilascio spinto di composti umici da suoli e sedimenti possono comportare interferenze per la quantificazione con la DPC [10].

Altro problema che viene sottolineato dai due autori è l'incapacità del metodo di correggere le interconversioni fra le specie, e se possibile di prevenirle durante i vari passaggi analitici, che come già affermato, vengono determinate dal pH e da agenti ossidoriducenti presenti in soluzione.

Un passo avanti in questo senso viene compiuto attraverso l'introduzione del metodo U.S. EPA 6800, che vede l'applicazione della spettrometria di massa abbinata ad un'innovativa tecnica analitica: la diluizione isotopica [11].

La diluizione isotopica è una tecnica che consente di correggere le interconversioni delle specie in analisi mediante l'aggiunta al campione di una quantità nota di una soluzione isotopicamente arricchita, ovvero contenente una percentuale elevata di un isotopo stabile dell'elemento in questione avente abbondanza naturale minore (Figura 3). Occorre quindi aspettare che si instauri un equilibrio tra gli isotopi, e successivamente si procede a prelevare un'aliquota del mix creato, che verrà sottoposta ad analisi mediante spettrometria di massa. Quest'ultima fornisce il valore del rapporto isotopico presente nell'aliquota prelevata, che avendo presupposto l'equilibrio fra le forme isotopiche, sarà uguale a quella dell'intero campione.

Nel nostro caso le specie oggetto di indagine sono due: il Cr(III) ed il Cr(VI). Abbiamo per questo bisogno di due soluzioni isotopicamente arricchite in due isotopi del cromo a minor abbondanza naturale. Il cromo possiede quattro isotopi naturali stabili: il 50 (4.345%), il 52 (83.789%), il 53 (9.501%) ed il 54 (2.365%). Per esempio si può aggiungere ai campioni di suolo una quantità nota di  $^{50}\text{Cr(III)}$  e di  $^{53}\text{Cr(VI)}$ ; si procede con l'estrazione e le seguenti fasi analitiche ottenendo in fine i rapporti isotopici 50/52 per il Cr(III) e 53/52 per il Cr(VI), attraverso i quali si può stimare la concentrazione del Cr(VI). Questa tecnica prevede anche delle formule che consentono di stimare le percentuali di conversione di una specie nell'altra.

Nel caso del Cr, durante l'estrazione, il Cr(III) può essere ossidato dall'eccessiva presenza di manganese o a causa delle condizioni di pH alcaline, fattore che dovrebbe prevenire il fenomeno contrario, ovvero la riduzione del Cr(VI), più stabile a pH basici. Nel suolo sono però notoriamente presenti agenti riducenti per il cromo, quali per esempio il ferro ed i composti organici, che vengono estratti contemporaneamente e si trovano in soluzione assieme all'analita [12].

Al di là della correzione postuma delle ossidoriduzioni cui va incontro il cromo, diventa importante la loro prevenzione, in quanto se troppo elevate compromettono la possibilità di una corretta quantificazione.

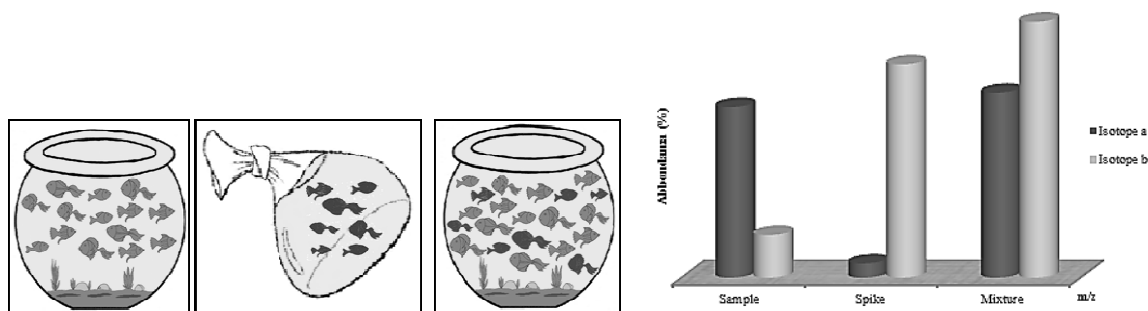


Figura 20. Immagine esplicativa del principio della diluizione isotopica

Occorreva quindi intervenire sulle condizioni di estrazione previste dalle metodiche U.S.EPA.

Nel 2012 Fabregat e coautori hanno dimostrato i vantaggi dell'uso dell'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) come soluzione estraente, ma anche come fase mobile nella separazione cromatografica [13]. La tecnica proposta consente di condurre una diluizione isotopica "single spike", cioè mediante aggiunta della sola soluzione isotopicamente arricchita per il Cr(VI). L'EDTA infatti si lega al Cr(III) chelandolo e inibendo in questo modo la sua ossidazione. Altro vantaggio dimostrato in questo articolo è la buona riuscita della separazione cromatografica della specie in meno di sette minuti e di una buona risoluzione dei picchi cromatografici. La tecnica estrattiva qui proposta prevede l'aggiunta dello spike (per esempio arricchito in  $^{53}\text{Cr(VI)}$ ) ad un'aliquota di campione di terreno, e della soluzione estraente composta da EDTA con un valore di pH pari a 10. Successivamente il campione viene sottoposto a due cicli di digestione assistita dalle microonde: il primo a 90°C per 5 minuti, per determinare l'equilibrio necessario fra gli isotopi, ed il secondo a 110°C per altri 5 minuti per assicurare un'estrazione quantitativa del cromo esavalente. Dopo aver centrifugato il campione, si procede alla separazione cromatografica cui segue la quantificazione attraverso spettrometria di massa.

Ad una prima applicazione della metodica appena descritta sui nostri campioni reali, i risultati ottenuti hanno però evidenziato una completa riduzione dello spike di  $^{53}\text{Cr(VI)}$  aggiunto, e di conseguenza dell'eventuale cromo esavalente naturale presente. Si è reso così necessario operare un adattamento del metodo agendo sulla fase di estrazione.

Ciò che è stato fatto a livello operativo è stata l'applicazione di diverse temperature e tempi di durata dei cicli di estrazione con le microonde. Le prove sono state condotte su campioni standard certificati e su un campione di suolo reale, in modo da monitorare la presenza del cromo esavalente nelle diverse condizioni imposte. Questo ci ha dato modo di perfezionare il metodo estrattivo, che applicato ai quattordici campioni di suolo in esame, ha permesso di verificare la presenza di cromo esavalente e la sua quantificazione.

Secondariamente è stato condotto un altro studio volto alla comprensione del fenomeno di riduzione del Cr(VI) aggiunto mediante diluizione isotopica, cercando di comprendere quali fossero gli agenti responsabili. In questo caso i campioni utilizzati provenivano dall'intero territorio lombardo e possedevano caratteristiche chimico-fisiche molto differenti tra di loro.

# Study of Cr(VI) reduction during alkaline extraction of soil samples from a contaminated area of Lombardia (Northern Italy) by using enriched stable isotopes and Isotope Dilution Mass Spectrometry

Laura Guidotti,<sup>†</sup> Silvia Queipo Abad,<sup>§</sup> Pablo Rodríguez-González,<sup>§</sup> J. Ignacio García Alonso,<sup>§</sup> Gian Maria Beone<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Faculty of Agriculture, Food and Environmental Science, Institute of Agricultural and Environmental Chemistry - Catholic University of Piacenza, Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza, Italy

<sup>§</sup>University of Oviedo, Faculty of Chemistry, Department of Physical and Analytical Chemistry, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

**Abstract** The aim of this work is the study of the hexavalent chromium reduction during the alkaline extraction of soil samples from an area of Lombardia (Northern Italy). Two different enriched stable isotopes of Cr (54 and 53) and Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) were employed to study the reduction extent of hexavalent chromium during the analytical procedure. The extraction of Cr(VI) from the solid samples was carried out applying focused microwaves in alkaline medium after Cr(III) complexation with EDTA. When applying extraction conditions previously reported for the analysis of Certified reference Materials we found an important reduction of Cr(VI) to Cr(III), avoiding the reliable Cr(VI) quantification in the soil samples. The influence of the organic matter and iron content in the samples on the Cr(VI) reduction was studied. The analytical method was adapted to obtain extraction conditions leading to the lowest Cr(VI) reduction extent and therefore, accurately quantify the Cr(VI) content in the soil samples coming from the area of Lombardia.

**Keywords.** Hexavalent chromium, soil, environmental pollution, Isotope Dilution Mass Spectrometry, chromium speciation, human health

## INTRODUCTION

Due to its toxicity and carcinogenic effect, the detection of Cr(VI) in environmental matrices is very important. In most cases, the presence of Cr(VI) is anthropogenic (Dayan and Paine 2001; WHO 1988) and the level of Cr(VI) species in nature depends on the pH value:  $\text{CrO}_4^{2-}$  (pH 6.5-14);  $\text{HCrO}_4^-$  and  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  (pH 0.7-6.5). The chemical form in which chromium is present in the environment determines its mobility and bioavailability. It can be present as a solid mineral in association with several cations leading to different chemical species with a large solubility range. The most insoluble compounds are those containing Pb, Ca and Ba, whilst dichromates are highly soluble in soil-water systems (Unceta et al. 2012).

Cr(VI) causes toxic and genotoxic effects on the human health. The strong acid and powerful oxidizing properties of soluble chromium ions are regarded as the primary cause of its irritant action and ulcers on epithelia. The inhalation of Cr(VI) compounds may cause marked irritation of the whole respiratory tract, provoking rhinitis, bronchospasm, pneumonia and bronchogenic carcinoma (WHO 1988). Studies in experimental animals have confirmed that Cr(VI) is carcinogenic by inhalation but not by ingestion or skin contact (Dayan and Paine 2001; WHO 1988). Machle and Gregorius (1948) conducted the first epidemiology study on chromate production workers in the United States of America. In this work they found that the 21,8% of the death in the chromate industry were due to cancer of the respiratory system. Langard (1990) published a review on the occasion of the centenary of the appearance of the first case of lung cancer due to exposure to hexavalent chromium reported in Scotland. The aim was to elucidate the influence of the chromium oxidation state on the carcinogenic potential. It was concluded "that all Cr(VI) compounds should be considered carcinogenic among exposed population" (Langard 1990). In adults the oral lethal dose is 50-70 mg of soluble chromates per kg of weight. The ingestion may cause liver and kidney necrosis (WHO 1988).

Several methods for the quantification of hexavalent chromium involve the use of diphenylcarbazide (DPC), starting from 1977, when the National Institute for Occupational Safety and Health proposed a method for the quantification of Cr(VI) in the atmospheric particulate (NIOSH 1997). In 1984 the USEPA proposed the first version of its protocol, the 3060 method which was subsequently modified in 1996 in the 3060A version for the extraction of the whole forms of Cr(VI) from soils, sludge, sediments and similar waste materials (USEPA Method 3060A 1996). This method involves an alkaline (pH 12) extraction with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH and a phosphate buffer. In these conditions all the insoluble and soluble forms of Cr(VI) are extracted. Under alkaline conditions the Cr(III)-Cr(VI) interconversions are minimized,

except when there is a high concentration of Mn, or a high Cr(III)/Cr(VI) ratio (Unceta et al. 2012). Pettine and Capri 2005 reported that the strong alkaline condition in the 3060A EPA method could cause the release of humic compounds in soils and sediments, causing interference for the quantification with DPC (Pettine and Capri 2005). Furthermore, none of these methods were able to correct interconversion reactions between Chromium species.

The redox equilibrium between Cr(III) and Cr(VI) during the different steps of the analytical procedure must be preserved. The pH value and the presence of reducing or oxidizing agents in the samples may be the major causes of the interconversions among the species. The first method capable to correct these interconversions was the U.S. EPA 6800: "Elemental and Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry" (U.S. EPA Method 2007). This method is a modified version of the 3060A, and suggests the addition of a double spike of  $^{50}\text{Cr(III)}$  and  $^{53}\text{Cr(VI)}$  after the Cr(VI) extraction from the solid matrices. The aim is to obtain the maximum level of extraction with the minimum rate of interconversion (U.S. EPA Method 6800 2007). More recently, Fabregat et al. (2012) demonstrated the advantages of the use of EDTA in the extraction phase to complex Cr(III) and prevent its potential oxidation to Cr(VI). It was demonstrated that Cr(III) was completely complexed by EDTA so that it was not necessary to apply double spiking IDMS to correct for species interconversion. Therefore, single spiking (addition to the sample of labelled Cr(VI)) was enough to obtain an accurate Cr(VI) quantification by IDMS. Also, EDTA facilitates the extraction of Cr(VI) from the solid samples by complexation of other metals forming insoluble chromates.

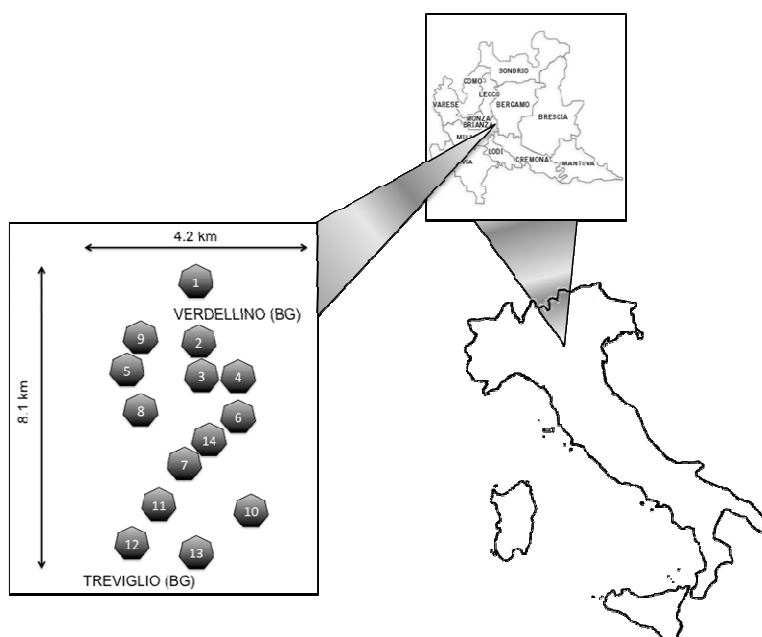
In this work we apply the extraction procedure developed by Fabregat et al. (2012) to the analysis of soil samples from the region of Lombardia (Northern Italy). The extraction conditions previously optimized by Fabregat et al (2012) with the analysis of Certified Reference Materials have been modified here to minimise the Cr(VI) reduction extent in the analysis of real samples. Softer extraction condition were applied on a set of soil samples coming from an area potentially contaminated by the diffusion of Cr(VI) in groundwater. Soil samples from a wider area with very different organic matter and iron content were then analyzed to correlate those characteristics with Cr(VI) reduction extent.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Instrumentation.** The digestion of the samples was carried out with a focused microwave system Explorer Hybrid (CEM, Mathews, NC) equipped with temperature and pressure feedback control and magnetic stirring. The chromatographic separation of the species was performed with a Dionex DX-120 LC System (Sunnyvale, CA, USA) and a Dionex Ion pack AS9-HC anion exchange column (PEEK, 4 x 250 mm x 9  $\mu\text{m}$ ). The chromium species were detected by ICP-MS using an Agilent 7500c quadrupole instrument (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octapole collision cell, using helium as collision gas (Fabregat et al. 2012). The determination of total iron content (%) was performed by X Ray Fluorescence Spectrometer (Philips PW2404) and the sample preparation was carried out by a semiautomatic press (SPECEAC, Orpington, UK). The percentage of organic carbon was obtained by Elementar CN (Hanau, Germany).

**Reagents and materials.** Ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA). was employed for the preparation of the extraction solution and the mobile phase for LC-ICP-MS analyses. The pH value of the mobile phase was adjusted to 10 with  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30% w/v) (Merck, Darmstadt, Germany). The enriched  $^{53}\text{Cr(VI)}$  and  $^{54}\text{Cr(III)}$  spike solutions were provided by ISC-Science (Oviedo, Spain). The mass fraction of the isotopically enriched stock solutions was quantified by reverse IDMS using natural abundance Cr(VI) and Cr(III) standard solutions. The Cr(VI) standard was prepared from a potassium dichromate reference material purchased from BAM (Federal Institute for Materials Research and Testing, Berlin, Germany) and the Cr(III) natural abundance standard was purchased by Fluka (Buchs, Switzerland). A reference material SRM 2701 (soil containing chromite ore processing residue) purchased from NIST (National Institute of Standards and Technology, USA), was analyzed in all measurement days for quality control purposes. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system Millipore (Bedford, MA, USA).

**Sampling site description.** This study was developed in the frame of a monitoring project developed in the Italian region of Lombardia with the aim of studying the quality of the agricultural soils of the whole region. In the past, the diffusion of two polluted water plumes (the first one in 2000, and the second in 2009) containing hexavalent chromium caused the contamination of the groundwater. Thus, we decided to detect the presence of Cr(VI) in the neighbouring agricultural soils. Fig 1 shows a map of the sampling area. The sampling points were selected to cover as much as possible the area suspected of being contaminated. In addition other 14 soil samples were collected in a wider area and the Fe and organic carbon content were determined to study the influence of both parameters on the Cr(VI) reduction during the alkaline extraction.



**Fig. 1** Map of the diffusion of the two polluted water plume and location of the collected soil samples to study the quality of the agricultural soils of the area

**Sample collection.** Each sampling point was georeferenced following the WGS84 system (World Geodetic System 1984), and a sampling document with several environmental data was compiled. These data included sample identification code, altitude, coordinates, pictures and a description of the context. For the collection of each sample, the operators constructed a square of 20X20 meters, subdivided in 25 4X4 meters subunit. Fifteen of these soils were sampled as soil cores with a diameters of 2,6 cm and a depth of 30 cm. The choice of the sampling depth was linked to the portion of soil involved in agricultural operations. The fifteen subsamples were homogenized to obtain a sample for the laboratory analysis. Coarse materials and crop residues were separated on field (Cenci 2008). Soil samples were air dried at 40°C until they reached a constant weight. Then they were mechanically disaggregated and sieved to 2 mm and 6 g of this part were milled to 200 micron with a Planetary Micro Mill pulverisette 7 classic line (Fritsch, Idar-Oberstein, Germany).

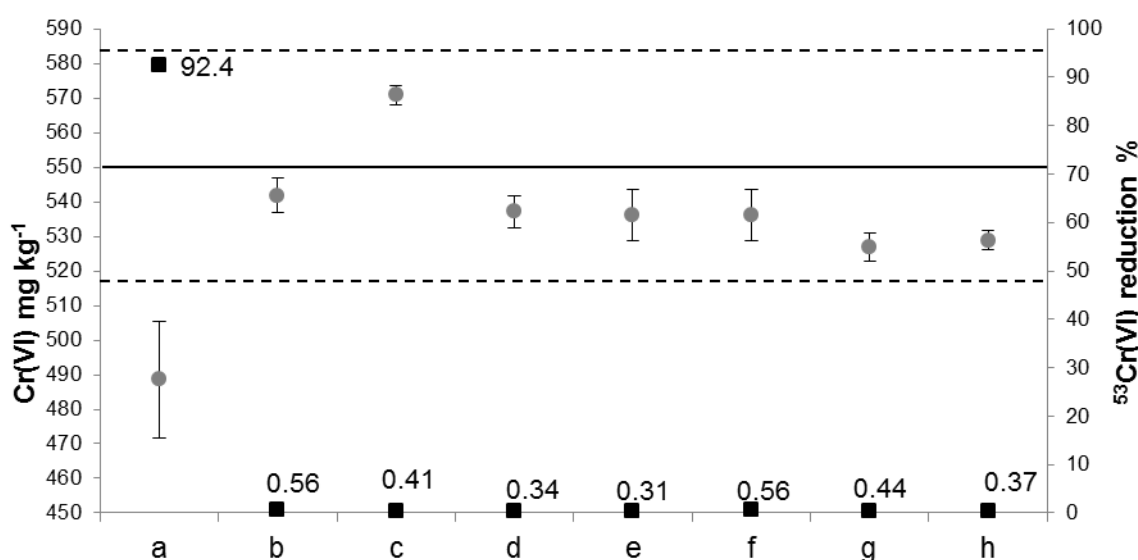
**Analysis of the samples by single spiking IDMS.** The species-specific IDMS procedure followed required the addition of isotopically enriched species to the sample in order to reach the isotope equilibration. An amount of 0.15 g of the soil sample was directly weighed in a 10 mL microwave glass vessel. Then a volume of 5 mL of 50 mM EDTA (pH 10) was added and finally the sample was spiked with 0.15 g of a  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  of  $^{53}\text{Cr(VI)}$ -enriched solution. When analyzing the standard reference material NIST 2701, 1 g of the  $5 \mu\text{g g}^{-1}$   $^{53}\text{Cr(VI)}$ -enriched solution was added due to its higher Cr(VI) concentration level. Then a 50 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  solution at pH 10 was added to the sample and the sample vial was closed after the addition of a stirring bar and placed in the focused microwave unit. The extraction was carried out 80°C during 5 minutes. After extraction, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 min and a portion of the extract was diluted 1:10 with Milli-Q water. When analysing the standard reference material NIST 2701, a 1:100 dilution with EDTA 5 mM was carried out due to its higher Cr(VI) concentration.

**Measurement of isotope ratios by LC-ICP-MS.** Typical operating conditions and analytical characteristics of these determinations by LC-ICP-MS have been described elsewhere (Fabregat et al. 2012). Integration of the chromatographic peaks was carried out using the commercial software supplied with the ICP-MS instrument. Isotope ratios were always computed as peak area ratios. The integration time per isotope selected was 50 ms and the isotopes measured were 50, 52, 53 and 54. The total integration time, 450 ms, was short enough to accurately follow the chromatographic peak profile. Mass bias correction was performed using an external correction, based on the bracketing of a natural standard with similar concentration of the sample, between each three injections. Mass bias corrected isotope ratios were employed to calculate the isotope abundances of hexavalent chromium. The concentration of the Cr(VI) compounds was then carried out by isotope pattern deconvolution (Garcia Alonso Rodriguez-Gonzalez, 2013). For this purpose, after the addition of the labelled  $^{53}\text{Cr(VI)}$ , the isotopic composition of the sample is expressed as a linear combination of the isotope pattern of both constituents of the mixture. Thus applying multiple linear regression the molar fraction of natural abundance compound and isotopically enriched compound can be calculated from the experimental mass spectra. As the ratio of molar fractions is equal to the ratio of moles, knowing the initial amount of enriched compound added to the sample, the moles of natural abundance compound can be directly obtained.

**Determination of the reduction extent in real samples.** The percentage of reduction of Cr(VI) in real samples was calculated by adding  $^{54}\text{Cr(III)}$  after the extraction step. In this way it was possible to quantify the amount of  $^{53}\text{Cr(VI)}$  initially added to the sample that was transformed to  $^{53}\text{Cr(III)}$  during the analytical procedure. The isotopic composition of Cr(III) in the sample measured by LC-ICP-MS was expressed as a linear combination of the isotopic composition of  $^{53}\text{Cr(III)}$ ,  $^{54}\text{Cr(III)}$  and natural abundance Cr(III). Then, the corresponding three molar fractions were calculated by multiple linear regression. The amount of  $^{53}\text{Cr(III)}$  was calculated from the molar fraction ratio of  $^{53}\text{Cr(III)}$  and  $^{54}\text{Cr(III)}$  and the known amount of  $^{54}\text{Cr(III)}$  added after the extraction step.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Optimization of the extraction conditions with the analysis of SRM 2701.** In contrast to the results presented by Fabregat et al (2012) in Certified Reference Materials, preliminary analysis of real soil samples from Lombardia showed a total reduction of the Cr(VI). Under these conditions, the application of single or multiple spiking IDMS is not possible. Therefore we had to modify the extraction conditions reported by Fabregat et al (2012) to significantly minimize Cr(VI) reduction. The original extraction procedure reported by Fabregat et al (2012) required two steps: a first cycle of 5 minutes at 90°C to facilitate the isotope equilibration between endogenous and isotopically labelled Cr(VI) and a second cycle at 110°C to ensure a quantitative extraction of Cr(VI) from the solid matrix. In this work, different conditions of temperature and time were tested in the analysis of the SRM 2701 as both parameters play a key role in the chromium reduction (Fabregat et al. 2012). Before the extraction,  $^{53}\text{Cr(VI)}$  was added to the samples to quantify the endogenous Cr(VI) by single spiking IDMS. Fig. 2 shows the endogenous Cr(VI) concentration obtained under different extraction conditions tested in the analysis of the SRM 2701 and the associated reduction extent.

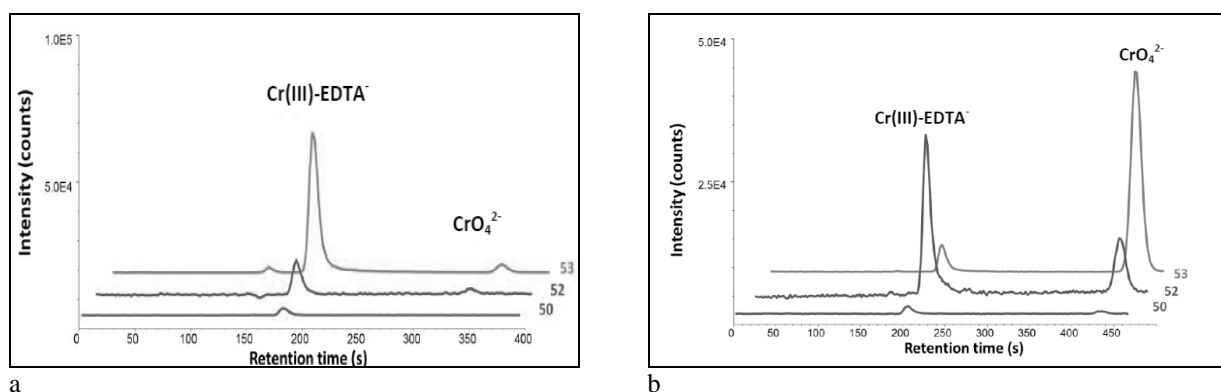


**Fig. 2** Concentration of Cr(VI) (circles) and percentage of reduction (squares) observed in the analysis of the standard reference material NIST 2701 under different extraction conditions (a: 5 min 90°C, 12 min 110°C; b: 5 min 90°C, 10 min 90°C; c: 5 min 90°C, 5 min 110°C; d: 5 min 90°C, 5 min 100°C; e: 5 min 90°C, 5 min 90°C; f: 5 min 80°C, 5 min 100°C; g: 5 min 80°C, 5 min 90°C; h: 5 min 80°C). The certified value of the material is indicated with a solid line, while the certified range of the value is indicated with dashed lines

As can be observed in Fig 2, all conditions tested provided Cr(VI) concentration within the certified interval of SRM 2701. The highest reduction level corresponded to 92% when a second microwave cycle of 12 minutes at 110°C was applied. In this case a significantly lower Cr(VI) concentration was obtained. According to these results the softest extraction conditions (only one cycle of microwave digestion of 5 minutes to 80°C) was selected for the further analysis of the real samples to minimise the Cr(VI) reduction extent.

**Analysis of real samples.** Fig. 3 shows a LC-ICP-MS chromatogram of a real sample spiked with  $^{53}\text{Cr(VI)}$  analyzed under the extraction conditions reported by Fabregat et al. (2012). For comparison Fig. 3 also shows a LC-ICP-MS chromatogram of the same sample applying the softer conditions selected above. As can be observed, when using a single microwave cycle of 80°C and 5 minutes the Cr(VI) reduction is significantly lower in comparison with that obtained when using the extraction conditions reported by Fabregat et al





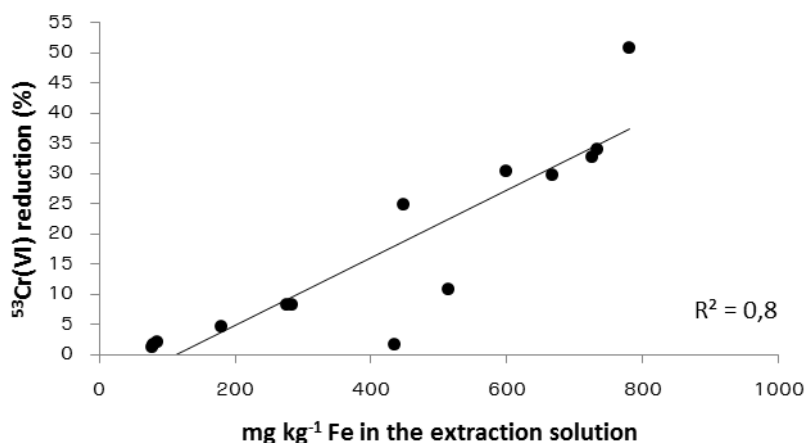
**Fig. 3** LC-ICP-MS chromatogram of a real soil sample extracted by focused microwaves using a) the extraction conditions reported by Fabregat et al (50 minutes at 90°C and 5 minutes at 110°C) and b) the extraction conditions selected in this work ( 5 minutes at 80°C)

Organic Matter content (% w/w) and the total Iron content (% w/w) of these samples. We decided to exclude the sulfur as a Cr(VI) reducer in our investigation, because according to Pettine and Capri (2005) an alkaline digestion minimize Cr(VI) reduction caused by sulfide and sulfite. Also, Pettine et al. (2006) showed that Cr(VI) reduction by sulphate became very slow under alkaline conditions. So the objective of this study was to correlate the level of Cr(VI) reduction with the Organic Matter content and with the iron content present in the extraction solution.

**Table 1** Organic Matter content (% w/w), total and extracted Iron content (% w/w, mg kg<sup>-1</sup>) and <sup>53</sup>Cr(VI) reduction (%) of 14 soil samples collected in the Lombardia region

SOIL SAMPLES	OM % w/w	Fe % w/w	Fe in the extractant mg kg <sup>-1</sup>	<sup>53</sup> Cr(VI) reduction %
150-MN	2.23	4.99	78	1.25
131-MN	2.26	4.91	80	1.69
029-BG	3.65	4.82	435	1.73
135-MN	2.31	5.32	85	1.97
133-MN	2.78	5.06	180	4.58
018-BG	6.93	1.86	276	8.26
064-CR	6.94	2.7	284	8.33
035BG	7.13	3.91	514	10.78
001-SO	4.72	5.72	448	24.8
125-MN	6.84	5.08	599	30.41
002-SO	2.94	4.82	667	33.6
050-VA	6.71	3.25	725	32.75
007-CO	4.05	5.83	733	33.92
004-CO	5.65	4.97	781	50.83

The reduction extent the <sup>53</sup>Cr(VI) was quantified in by adding <sup>54</sup>Cr(III) after the extraction step. The results obtained are given in Table 1 As can be seen the level of reduction, after the application of these softer extraction conditions were between 1.6% and 30%, which allow a reliable quantification of Cr(VI). According to these results the softer extraction conditions could be employed for the analysis of real samples with a high content of organic matter and Fe. Then, we tried to give an interpretation of the obtained results considering different parameters that may influence the hexavalent chromium reduction in the liquid extraction solution. For this purpose, the level of Cr(VI) reduction was correlated first with the Organic Matter content and secondly, with the iron content present in the extraction solution. However, we could only establish a correlation between extracted iron and Cr(VI) reduction as observed in Fig 4.



**Fig.4** Correlation of the Cr(VI) reduction with the Fe content in different analyzed real soil samples from the region of Lombardia

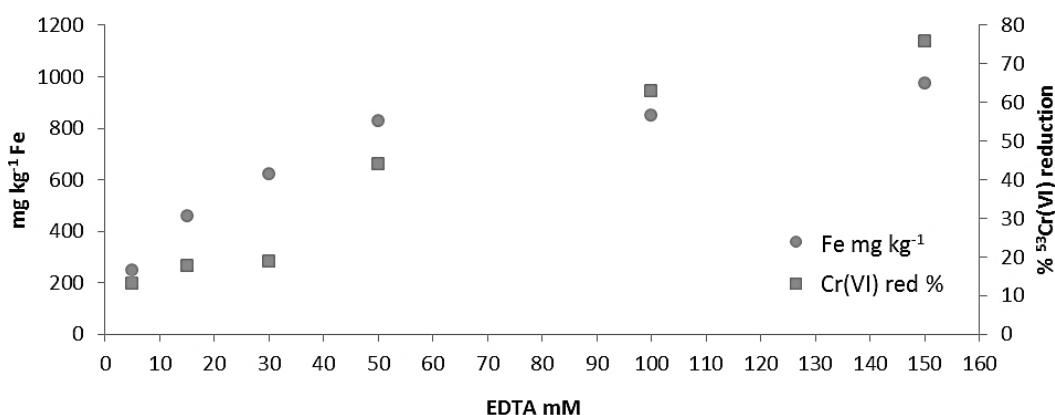
Cr(VI) is a strong oxidant and is reduced ( $\text{CrO}_4^{2-}$  and  $\text{HCrO}_4^-$ ) in the presence of electron donors. In the soil we can commonly find aqueous Fe(II), ferrous iron minerals, and organic matter as electron donors (Palmer and Puls 1996). Several minerals in geologic materials contain ferrous iron, that is potentially available for the reduction of Cr(VI). These minerals may be silicates (olivine), oxides (magnetite, hematite) or sulfides (pyrite). Pyrite can reduce Cr(VI) even in slightly alkaline conditions (Wittbrodt and Palmer 1996).

Another important reducer of Cr(VI) is the soil organic matter, principally present as humic and fulvic acids. A number of organic compounds may react with Cr(VI), like carboxylic and hydroxycarboxylic acids, aldehydes, phenols (Pettine and Capri 2005). In many environmental compartments organic compounds are the principal reducers, even if several studies have shown that they react slowly with Cr(VI). When the pH value is near to the neutrality, the reduction of Cr(VI) by compounds with oxygen functional groups, has half-lives ranging from months to many years. Fe(II) is much more reactive.

Organic matter seems to better influence Cr(VI) reduction at acidic pH values. Wittbrodt and Palmer (1995) conducted some experiment in aqueous solution, to study the role of soil fulvic acids and soil humic acids in the Cr(VI) reduction. SFA and SHA had an excess concentration with respect to Cr(VI). They found that Cr(VI) reduction rate increased with the decrease of pH value. Kozuc et al.(2000) conducted an experiment with the aim of explaining the mechanism of soluble Cr(VI) reduction with organic matter. They extracted soluble organic matter from peat and clay soil and found that the reduction of Cr(VI) due to organic matter does not started until 10 days of experiment. They concluded that this process is very slow and requires a high amount of accessible organic matter. It depends also on the specific organic compound. They demonstrated also that soluble Fe(III) could block active organic sites and decrease the reduction of Cr(VI). Buerge and Hug (1998) concluded that there is probably a synergistic behaviour between soil organic compounds and Fe(II) in the reduction of Cr(VI). Fe(II) promotes the reduction of hexavalent chromium acting as a redox catalyst, in several reactions. The reduction of Cr(VI) by soil organic compounds it is also implemented by the presence of Fe(III): it is first reduced by humic substances and then oxidized by Cr(VI) in a redox cycle. Under strong alkaline conditions of extractions, humic compounds are released by soils and sediments. In these conditions of pH value of 10 also the Fe(III) solubility is incremented (Millero et al. 1995). Several authors investigate the role of iron in Cr(VI) reduction, even in alkaline conditions. For example Eary and Ray (1988) tested and demonstrated the capability of Fe(II) to reduce Cr(VI) in solution in a pH range of 2-10. ¿He? (2003) conducted a series of experiments to investigate Cr(VI) reduction in alkaline conditions, in both homogeneous system and heterogeneous system (single mineral phase biotite and magnetite, and mixture of mineral phases). He found in homogeneous system with high pH, a rapid reduction of Cr(VI) due to aqueous Fe(II) increasing with the Fe(II)-Cr(VI) ratio.

Our results seemed to underline a correlation among the iron extracted and the reduction of the  $^{53}\text{Cr(VI)}$ . In order to limit the presence of this element in the extraction solution, we tried to modify the molarity of the EDTA. Using the sample with the highest level of extracted Fe, we tested different EDTA concentrations: 5, 15, 30, 50, 100 and 150 mM. Then, we determined the level of  $^{53}\text{Cr(VI)}$  reduction, and the quantity of iron extracted with these new conditions.. The results are shown in Fig 5 and as can be observed the extent of Cr(VI) reduction and the Fe concentration in the extractant increases with the EDTA concentration. An increment in the molarity of EDTA extraction solution does not affect the level of organic matter extraction, but can cause a higher Fe(II) and Fe(III) solubilisation. Trivalent iron may affect the rate of reduction due to the humic substances, by the formation of complexes and the limitation of the accessibility for the reduction of Cr(VI) (Wittbrodt and Palmer 1996).

Then, we decided to test 2 extraction solutions with a molarity of 15 and 30 mM, using the standard reference material SRM 2701, in order to establish if these conditions allowed a quantitative extraction of the Cr(VI). Unfortunately when decreasing the EDTA concentration, the Cr(VI) concentration in the SRM 2701 did not reached the certified values. This means that EDTA 50 mM was probably the best compromise to obtain a quantitative Cr(VI) extraction.



**Fig. 5** Correlation among EDTA concentration in the extraction solution with the percentage of Cr(VI) reduction and the Fe concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the extraction solution of the soil sample 004-CO.

Finally, in order to limit the presence of free Fe(II) in the extraction solution, we added fenantroline (Buerge and Stephan 1998) to the soil sample 004-CO at different concentration levels (0.96, 1.68, 2.4 mM) as an Fe(II) complexant agent. This led to a typical red colour in the extraction solution due to the formation of the complex among Fe(II) and fenantroline. Under these conditions the level of iron in the extraction solution did not change and the Cr(VI) reduction remained high.

In spite of these results, it is worth stressing that using a single microwave cycle of 80°C and 5 minutes it was possible to analyse all the real samples to assess the Cr(VI) contamination in the studied agricultural area. Table 2 shows that the Cr(VI) concentrations for all samples was lower than the limit established in the Italian regulation of 10  $\text{mg kg}^{-1}$  of Cr(VI) (D.Lgs. 152/06). According to these results, we can affirm that there is no soil contamination and it seems that there is no correlation among the polluted water diffusion and the Cr(VI) concentration in soil samples

**Table 2** Cr(VI) quantification ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the soil samples from the agricultural area of the region of Lombardia studied in this work

	Cr(VI) $\text{mg kg}^{-1}$	Standard Deviation
CR1	0.23	0.040
CR2	0.64	0.020
CR3	0.24	0.020
CR4	0.3	0.020
CR5	0.25	0.010
CR6	0.33	0.010
CR7	1.38	0.010
CR8	2.40	0.030
CR9	0.48	0.040
CR10	1.25	0.001
CR11	0.25	0.020
CR12	0.55	0.010
CR13	0.49	0.050
CR14	0.51	0.01

## CONCLUSIONS

The purpose of our work was to adapt a previously developed procedure for the quantification of hexavalent chromium in solid samples by IDMS to assess the Cr(VI) contamination in an agricultural area of northern Italy. The IDMS procedure had to be modified by selecting softer extraction conditions to minimize the reduction of Cr(VI) and hence, obtain accurate determinations in soil samples with very different physicochemical properties. Our data have shown a correlation among the Cr(VI) reduction and the presence of iron in the extraction solution. In order to limit this phenomenon we tested a higher EDTA concentration in the extraction solution and the addition of fenantroline. It was found that 50 mM EDTA was the best compromise to obtain a quantitative Cr(VI) extraction and that the new softer extraction conditions of 80°C and 5 minutes allowed the quantification of hexavalent chromium in our soil samples as the extent of Cr(VI) were in all cases below 30%. It is worth stressing that Cr(III) oxidation was not observed in any of

the samples. Therefore, applying the alkaline extraction with EDTA, single spiking IDMS could be employed for the reliable quantification of the soil samples.

## References

- Buerge IJ, Hug SJ (1998) Influence of Organic Ligands on Chromium(VI) Reduction by Iron(II). *Environ Sci Technol* 32:2092- 2099
- Cenci RM (2008) Guidelines for the use of native mosses, transplanted mosses and soils in assessing organic and inorganic contaminant fallout. EUR 23292 EN. ISBN 978-92-79-08719-6. ISSN 1018-5593. 35 pp
- Dayan AD, Paine AJ (2001) Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* 20:439. doi: 10.1191/096032701682693062
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006 n°152, Norme in materia ambientale, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96
- Eary LE, Rai D (1988) Chromate removal from aqueous wastes by reduction with ferrous ion. *Environ Sci Technol* 22(8):972-977
- Fabregat N, Rodriguez-Gonzalez P, Castillo A, Malherbe J, Roig Navarro A, Long S, Garcia Alonso JI (2012) Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol* 46 (22):12542–12549. DOI: 10.1021/es3022864
- Garcia Alonso JI and Rodriguez-Gonzalez P (2013) *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. RSC Publishing, Cambridge
- Pettine M, Tonnina D, Millero FJ (2006) Chromium(VI) reduction by sulphur(IV) in aqueous solutions. *Mar Chem* 99:31–41
- He Y (2003) Chromate reduction and immobilization under high pH and high ionic strength conditions. Dissertation. Ohio State University
- Kozuh N, Stupar J, Gorenc B, (2000) Reduction and Oxidation Processes of Chromium in Soils. *Environ Sci Technol* 34:112-119
- Langard S (1990) One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports. *Am J Ind Med* 17:189-215
- Machle W, Gregorius V (1948) Cancer of the respiratory system in the United States chromate-producing industry. *Public Health Rep* 63:1114-27
- Millero FJ, Yao W, Aicher J (1995) The speciation of Fe(II) and Fe(III) in natural waters. *Mar Chem* 50: 21-39
- NIOSH (1977) *Manual of Analytical Methods*, 2nd. ed., V. 1, P&CAM 169, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Publ. (NIOSH) 77-157-A (1977)
- Pettine M, Capri S (2005) Digestion treatments and risks of Cr(III)-Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments – a review. *Anal Chim Acta* 540:231–238
- Palmer CD, Puls RW (1994). Natural attenuation of hexavalent chromium in groundwater and soils. EPA/540/S-94/505 EPA Environmental Assessment Sourcebook.  
<http://epa.gov/ada/pubs/issue.html>
- Unceta N, Séby F, Malherbe J, Donard OFX (2010) Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review. *Anal Bioanal Chem* 397:1097–1111. DOI 10.1007/s00216-009-3417-1
- USEPA (1996) Method 3060A alkaline digestion for hexavalent chromium, revision 1
- U.S. EPA (2007) Method 6800 elemental and speciated isotope dilution mass spectrometry, revision 0, February 2007
- WHO Environmental Health Criteria 61, Geneva, 1988
- Wittbrodt PR, Palmer CD (1995) Reduction of Cr(VI) in the Presence of Excess Soil Fulvic Acid. *Environ Sci Technol* 29:255-263
- Wittbrodt PR, Palmer CD (1996) Effect of Temperature, Ionic Strength, Background Electrolytes, and Fe(III) on the Reduction of Hexavalent Chromium by Soil Humic Substances. *Environ Sci Technol* 30 (8):2470–2477

### 3.3 Caratterizzazione biologica dell'area

Tabella 3.3.1. Parametri biologici indagati

Parametri biologici	
◦	Valutazione della tossicità di diossine e composti diossino-simili
◦	Valutazione potenziale genotossico
◦	Attività microbica, fertilità biologica
◦	Attività enzimatica
◦	Caratterizzazione comunità lombrichi

La Tabella 3.3.1 elenca i parametri biologici indagati nell'area, mentre i grafici radar riportati in seguito illustrano in maniera sintetica i risultati ottenuti per tutti i parametri – chimici, fisici e biologici – considerati nel nostro progetto. Nei radar relativi agli EPT i parametri rappresentati dall'indicatore giallo sono quelli che hanno sfiorato il limite contenuto nella tabella A del D.Lgs. 152/06. Il cromo, principale causa per cui l'area è stata sottoposta ad indagine non ha sfiorato i limiti imposti come cromo trivalente, mentre come cromo esavalente ha presentato un solo sfioramento del limite tabellare A, in CR8. Anche CR7 e CR10 hanno mostrato concentrazioni di Cr(VI) più alte rispetto agli altri punti, ma non sufficienti a stabilire un nesso tra essi e gli eventi di contaminazione avvenuti in passato.

Ciò che spicca dai radar relativi alle molecole organiche persistenti è il livello di presenza dei ritardanti di fiamma. Dato che per questa categoria non esistono limiti di legge relativi alla concentrazione ammissibile nel suolo, e per costruire le classi di valutazione ci siamo serviti dei dati ottenuti dall'analisi dei campioni della prima fase del progetto. Le concentrazioni stimate in quest' area sono quasi tutte superiori al 95° percentile ottenuto nella prima fase, indicando che in questa area specifica sono molto più presenti.

Gli altri inquinanti organici sono tutti inferiori limiti di legge. La categoria dei pesticidi clorurati (di cui fa parte il DDT), ha mostrato valori più elevati nei punti CR2, CR10 e CR8. Altra particolarità legata al sito CR10 è emersa dall'analisi effettuata mediante sistema Calux per valutare la biodisponibilità di diossine e molecole diossino-simili, dalla quale si nota che proprio questo punto è stato l'unico a causare una risposta da parte dei biosensori applicati. La Figura 3.3.2 illustra quanto appena affermato e mostra che anche nel caso di diossine e composti diossino-simili CR8, e CR2 sono i punti in cui le sostanze hanno maggior concentrazione.

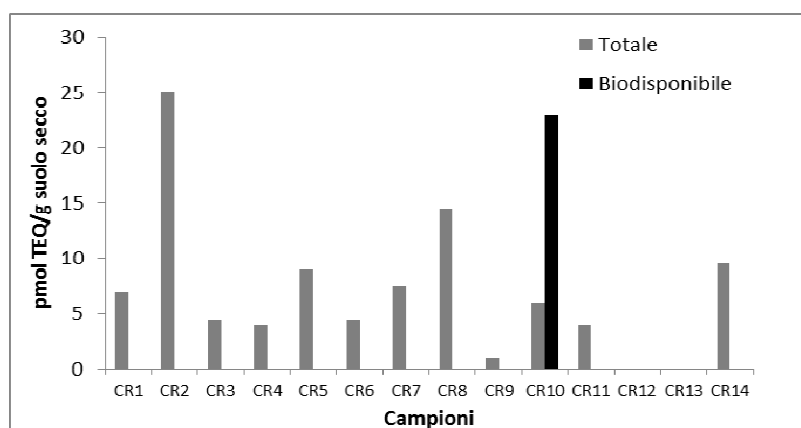


Figura 3.3.2. Risposta del biosensore DR-CALUX alla frazione totale e biodisponibile di diossine e molecole diossino-simili nei campioni

I dati ottenuti attraverso la valutazione del potenziale genotossico degli elementi e delle sostanze presenti nel terreno, indicano la probabile presenza nel suolo di contaminanti genotossici, almeno parzialmente biodisponibili per

l'indicatore *Trifolium r.*, che vengono traslocati al germoglio. I terreni sono tutti moderatamente genotossici.

Le **Figure 3.3.4 e 3.3.5** mostrano i diversi parametri biologici relativi alla popolazione microbica e alla sua attività, divisi per destinazione d'uso del suolo.

Rapportando il valore  $C_{micr}$  al carbonio organico totale e moltiplicandolo per 100 si ottiene il coefficiente microbico  $C_{bio}$ , utile a definire l'andamento della comunità microbica nei confronti della sostanza organica presente nel suolo [14]. Nell'area considerata tale rapporto ci ha permesso di stimare che il carbonio della biomassa microbica costituisce dallo 0.2 % m/m (CR10 e CR13) all'1.7% m/m (CR7) del carbonio organico totale. Queste percentuali oscillano quindi fra valori bassi e valori nella media (*Tabella 3.3.2*).

*Tabella 3.3.2. Valori di  $C_{bio}$  dei punti dell'area in esame*

sito	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	CR6	CR7	CR8	CR9	CR10	CR11	CR12	CR13	CR14
<b><math>C_{bio}</math> (%)</b>	0,75	0,61	0,54	1,15	1,36	0,78	1,68	0,72	0,88	0,25	0,41	0,93	0,21	0,48

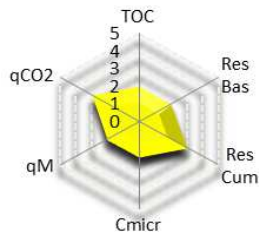
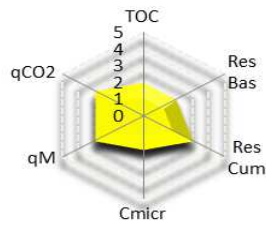
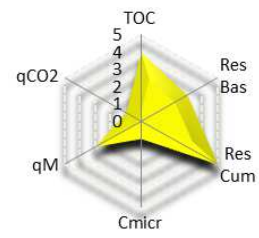
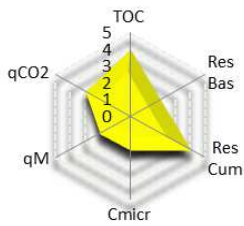
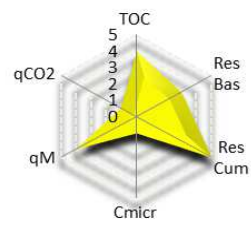
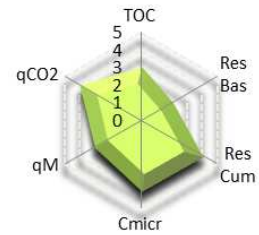
La funzionalità dei microrganismi viene valutata mediante la respirazione basale, che è influenzata dall'energia disponibile (mancanza o eccesso di carbonio nel suolo) e dalla quantità di microrganismi presenti. Alti valori di  $C_{bio}$  e di respirazione solitamente indicano un miglior stato dei microrganismi del suolo, a patto che la respirazione non sia elevata a livelli anomali. Dai grafici radar emerge che CR2, CR10 e CR11 presentano alti valori di TOC e respirazione basale, ma bassi livelli di popolazione microbica.

La respirazione basale viene anche relazionata alla biomassa microbica per ottenere il quoziente metabolico, che fornisce un'idea circa l'efficienza di utilizzazione dell'energia disponibile e di conseguenza anche della stabilità o meno dell'ecosistema. Una condizione di stress può presentare sia livelli alti di tale quoziente (segno di una ridotta biomassa microbica), che bassi livelli, segnale di una minor efficienza di uso delle risorse disponibili.

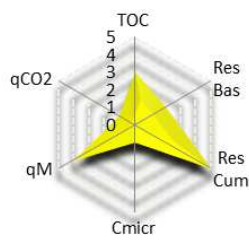
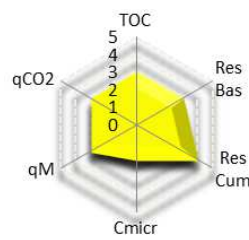
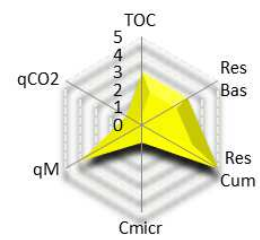
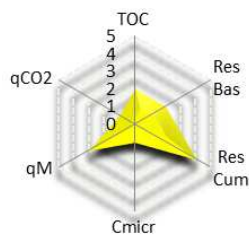
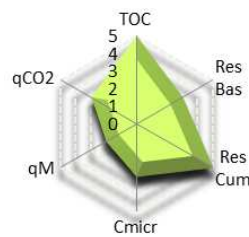
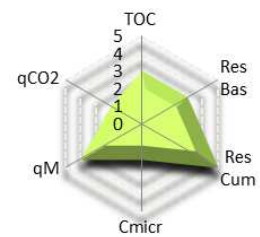
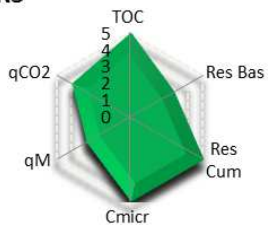
Secondo il metodo di stima della fertilità biologica emerge la prevalenza di una condizione di fertilità media, un caso di stress-preallarme ed uno in cui si ha alta fertilità biologica. L'unico sito a destare preoccupazione da questo punto di vista è il CR14, dove è stata rilevata la condizione di stress (*Tabella 3.3.3*). Da uno sguardo agli altri parametri chimici e biologici indagati non emergono però altri dati allarmanti.

*Tabella 3.3.3. Risultati parametri biologici Som(Sostanza Organica); Toc(Carbonio Organico); Resp\_bas(Respirazione basale); Resp\_Cum(Respirazione Cumulativa);  $C_{micr}$ (Biomassa Microbica);  $Q_m$  (quoziente di mineralizzazione);  $qCO_2$ (quoziente metabolico);  $I_{bf}$ (indice di fertilità biologica).P: punteggio assegnato ai parametri.*

sigla	CO (%)	P	Res Bas (mg kg <sup>-1</sup> )	P	Res Cum (%)	P	$C_{micr}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	P	$qM$ (%)	P	$qCO_2$ (10 <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	P	Fertilità	IBF
CR1	1,5	2	5,7	2	285	3	113	2	2,0	3	0,21	3	media	15
CR2	2,3	4	15,2	4	766	5	141	2	3,5	4	0,45	1	buona	20
CR3	1,8	3	9,6	2	559	4	98	1	3,1	4	0,41	1	media	15
CR4	1,3	2	8,8	2	382	3	149	2	2,9	3	0,25	3	media	15
CR5	3,5	5	14,6	3	757	5	476	5	2,1	3	0,13	4	alta	25
CR6	3,2	5	12,3	3	615	5	251	3	1,9	2	0,20	4	buona	22
CR7	2,0	4	8,7	2	460	4	336	4	2,3	3	0,11	4	buona	21
CR8	2,5	4	8,8	2	466	4	180	2	1,9	2	0,20	4	media	18
CR9	1,9	3	13,4	3	618	5	168	2	3,3	4	0,33	2	buona	19
CR10	2,2	4	11,1	3	625	5	54	1	2,8	3	0,85	1	media	17
CR11	2,2	4	13,0	3	672	5	91	1	3,1	4	0,60	1	media	18
CR12	2,0	4	11,6	3	480	4	185	2	2,4	3	0,26	3	buona	19
CR13	1,7	3	10,9	3	577	4	35	1	3,3	4	1,28	1	media	16
CR14	1,3	2	8,1	2	376	3	62	1	2,8	3	0,54	1	stress	12

**CR1****CR4****CR10****CR8****CR11****CR7**

**Figura 3.3.4. Grafici radar costruiti a partire dai diversi parametri costituenti l'indice di fertilità biologica (IBF) relativi ai punti CR ricadenti all'interno dei campi coltivati a mais**

**CR3****CR12****CR13****CR14****CR6****CR9****CR5**

**Figura 3.3.5. Grafici radar costruiti a partire dai diversi parametri costituenti l'indice di fertilità biologica (IBF) relativi ai punti CR ricadenti all'interno di terreni dedicati a prato**

Le attività enzimatiche del suolo analizzate (Tabella 3.3.2.) sono state rapportate al contenuto di carbonio organico e confrontate con quelle ottenute in fase generale. In questo caso i 50°, 75° e 95° percentili sono stati considerati valori di riferimento per la costruzione delle classi di valutazione. In generale l'attività della betaglucosidasi è elevata in tutti i punti, sintomo di una buona disponibilità di energia per gli organismi presenti nel terreno, essendo essa coinvolta nel ciclo del carbonio. Le altre due attività enzimatiche prese in considerazione – esterasi e leucina aminopeptidasi – mostrano valori variabili all'interno dell'area ma mai critici, essendo paragonabili a quelli derivanti dalla fase generale.

Tabella 3.3.2. Valori ottenuti per le nove attività enzimatiche analizzate (da sinistra: fosfomonoesterasi acida, fosfodiesterasi, pirofosfato-fosfodiesterasi, leucina aminopeptidasi, arisulfatasi, chitinasi, betaglucosidasi, acetato esterasi, fosfomonoesterasi alcalina) (nanomoli di 4-metilumbelliferone per g di CO)

	acP	bisP	piroP	leu	aryS	chit	b-gluc	ester	alkP
CR1	3281	1468	345	1554	173	777	950	108452	5958
CR2	2590	1679	288	1967	144	432	815	101259	9210
CR3	4457	2842	517	1873	258	710	969	165215	9946
CR4	2336	519	87	1298	87	692	1038	85651	1730
CR5	6681	3888	1208	2529	264	944	2340	174430	15363
CR6	2678	1109	306	1377	268	306	803	121614	3481
CR7	1768	1037	244	1037	61	732	610	70005	5305
CR8	2529	1468	326	1876	122	489	775	78971	6404
CR9	3945	2367	546	2792	182	1153	1214	118041	9771
CR10	2102	1161	277	1327	111	719	719	85007	6194
CR11	1851	1080	257	1183	51	617	514	54501	8432
CR12	7461	4288	1175	1880	411	881	1057	211774	13276
CR13	2486	1350	142	994	71	994	781	88574	2841
CR14	3348	969	88	1586	88	441	793	86781	2995

Per quanto riguarda la caratterizzazione della comunità dei lombrichi, la loro densità media variava tra 59 e 247 ind. m<sup>2</sup>, e fra 97 e 477 ind. m<sup>2</sup>, rispettivamente nei siti coltivati a mais e per quelli dedicati a prato. La biomassa media variava tra 54 e 96 g m<sup>-2</sup> per i punti ricadenti in terreni dedicati alla produzione di mais, e tra 31 e 205 g m<sup>-2</sup> per quelli dedicati a prato.

In quest'area non si riscontra un impatto significativo del tipo di uso del suolo sulle biomasse e sulle densità dei lombrichi (K-Wallis 5%, p=0.08, n.s.). I più alti valori sono stati registrati in zone praticole (CR5 e CR12), mentre i più bassi in Cr3 (prato) per

la biomassa, e in Cr8 (mais) per la densità. Non è stato possibile collegare i valori ottenuti per questi parametri a particolari posizioni all'interno dell'area.

Anche le strutture funzionali (Figura 3.3.1) presentavano un'alta variabilità fra siti e fra le due destinazioni d'uso del suolo. In base a ciò possiamo affermare che i lombrichi appartenenti al gruppo endogeo erano meno presenti in quei punti ricadenti nei prati centrali dell'area campionata (CR3-CR5-CR6-CR14), mentre mostravano alta densità nei prati situati all'estremità dell'intera zona campionata (CR2-CR12-13). Questa variabilità era meno pronunciata o inesistente nel caso dei campi colti vati a mais. Per quanto riguarda il gruppo epigeo il punto CR10 spicca a causa dell'elevata densità che il gruppo funzionale mostra in tale sito, di cui rappresenta il 60% degli individui raccolti.



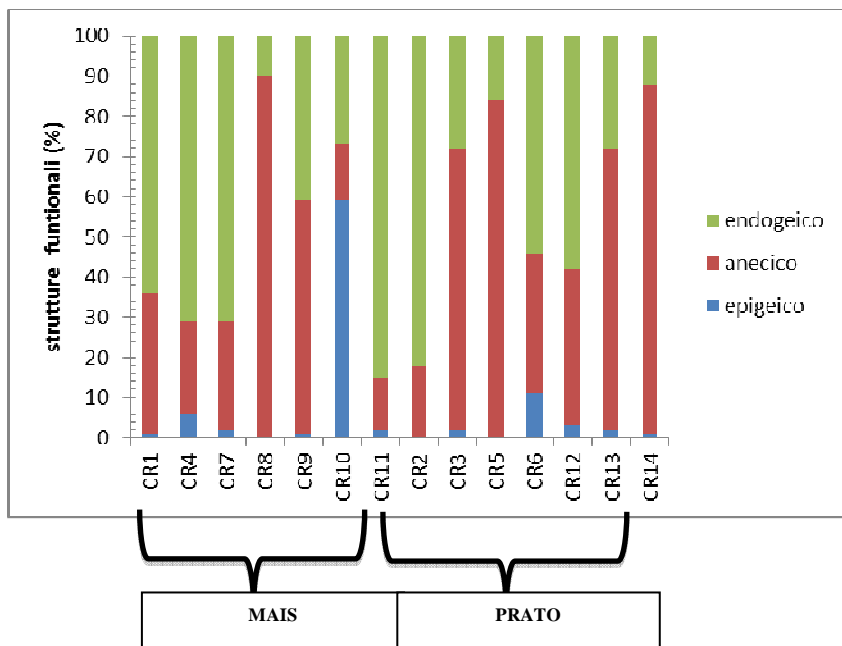


Figura 3.3.3. Composizione della struttura funzionale delle comunità dei lombrichi

Tra i 14 siti CR10 appare particolare in base alla sua alta densità di individui appartenenti al gruppo epigeo, che rappresenta il 60% dei lombrichi. La differenziazione del sito CR10 in termini di struttura tassonomica è confermata dalla analisi delle componenti principali. Tale analisi condotta considerando le densità tassonomiche ha sottolineato la chiara differenziazione della struttura del punto CR10; quella ottenuta considerando invece i parametri del suolo ha messo in luce la differenziazione del sito CR2. Nel punto CR10 la differenza può essere dovuta alla presenza di tre specie epigee *Eiseniella tetraedra*, *Lumbricus rubellus Castaneus* e *Lumbricus rubellus Rubellus*, le cui densità sono correlate con la presenza di cromo, per il quale il punto CR10 mostra la maggior concentrazione dell'intera area (87 mg kg<sup>-1</sup>).

La differenziazione del sito CR2 può essere interpretata dalla maggior concentrazione di alcuni metalli quali As, Cu, Sn, Zn. Il risultato della PCA non ha indicato però alcuna relazione tra la presenza di questi elementi ed un impatto negativo sui lombrichi.

Lo studio della struttura tassonomica ha permesso di determinare alcune differenze fra le comunità. Il sito CR10 è il più differenziato e possiede una struttura tassonomica particolare, con le tre specie già citate; la densità di queste specie potrebbe essere legata alla concentrazione del cromo (così come con il cobalto ed il manganese). Un'ipotesi è che le specie ET ed LR siano più adatte a questo tipo di contaminazione, quindi non si può escludere che le sottospecie LRR ed LRC possano derivare da effetti mutagenici di sostanze presenti in questo punto.

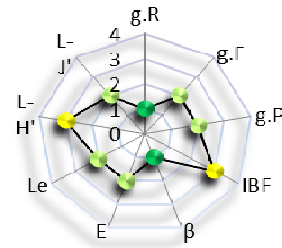
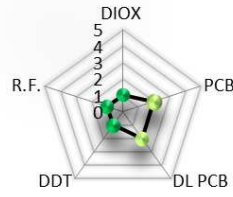
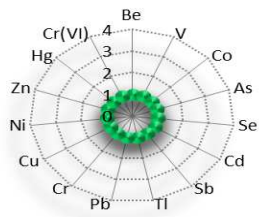
L'indice H' (diversità di Shannon-Wiener), che considera il numero delle specie e la loro frequenza all'interno della comunità, risulta basso in tutti i punti ad eccezione di CR14, mentre l'indice J di equitabilità presenta valori più variabili, con il minimo in CR8. In esso quindi le specie presenti non sono equamente rappresentate.

**EPT**

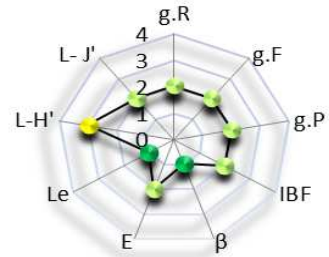
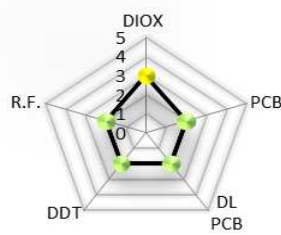
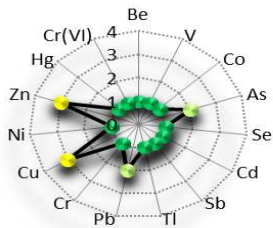
**Inquinanti organici xenobiotici**

**Indicatori biologici**

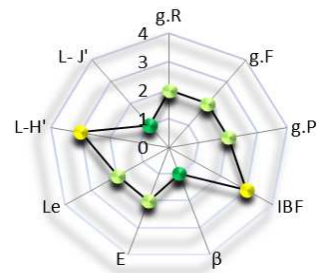
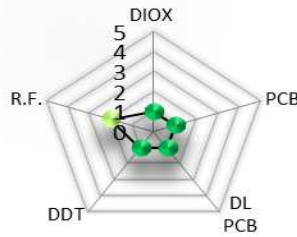
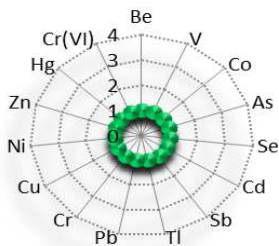
**CR1**



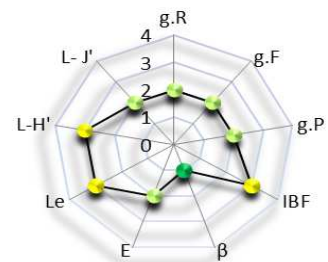
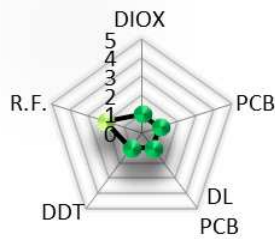
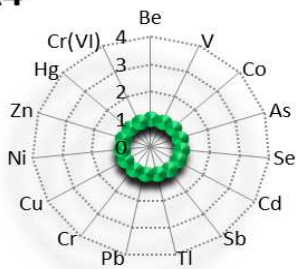
**CR2**



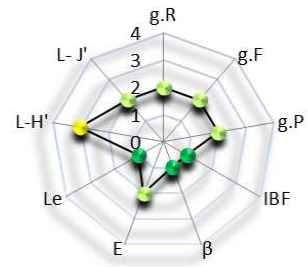
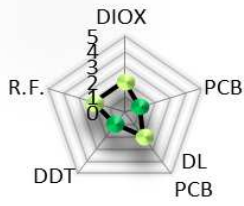
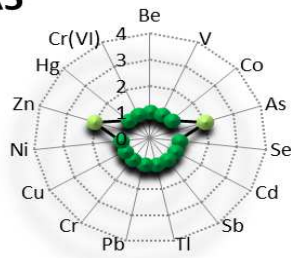
**CR3**



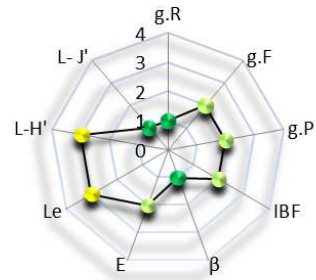
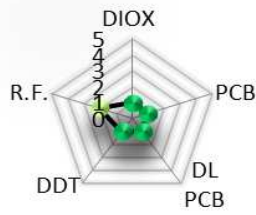
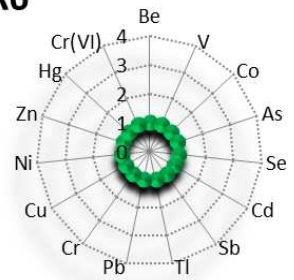
**CR4**



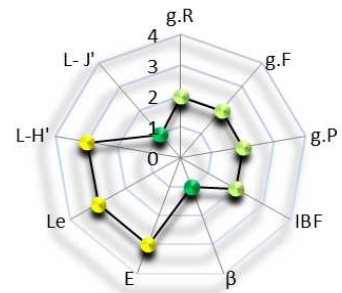
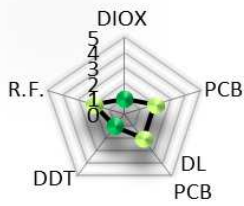
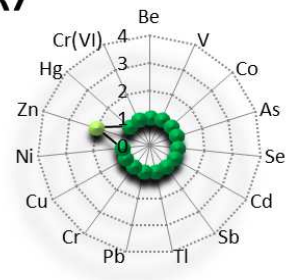
### CR5



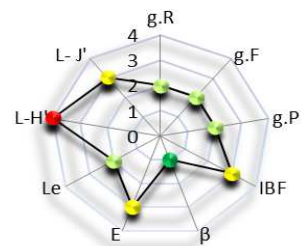
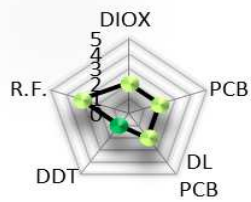
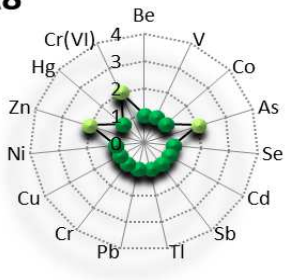
### CR6



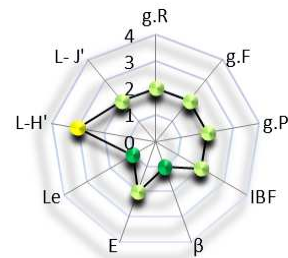
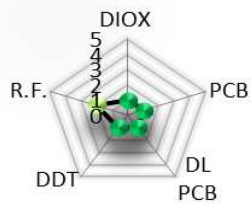
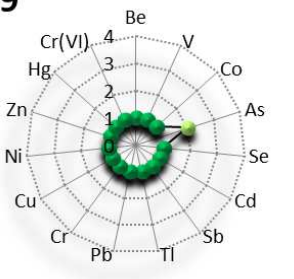
### CR7



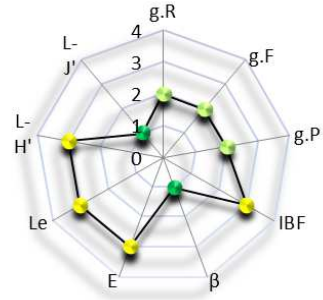
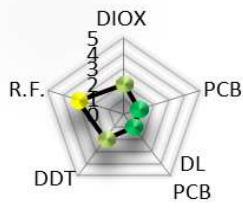
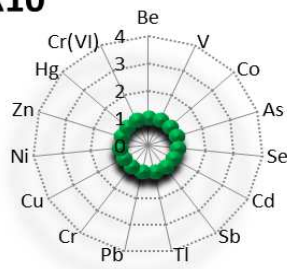
### CR8



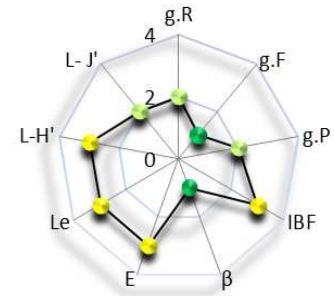
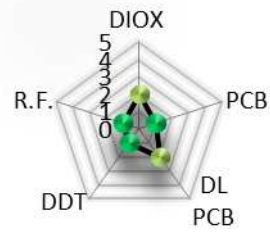
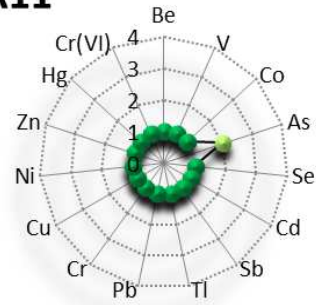
### CR9



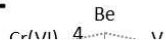
### CR10



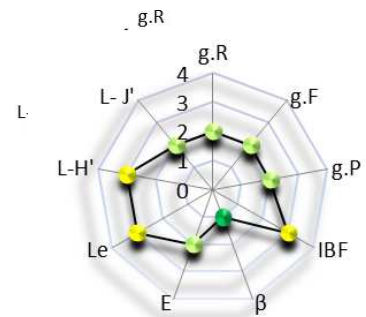
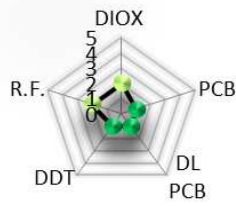
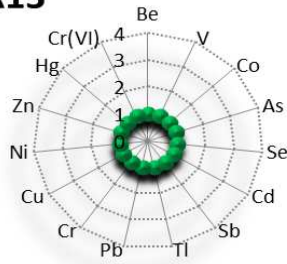
### CR11



### CR12



### CR13



### CR14

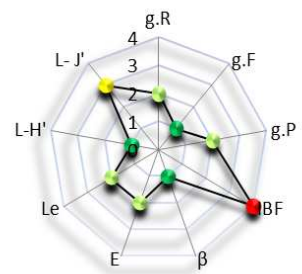
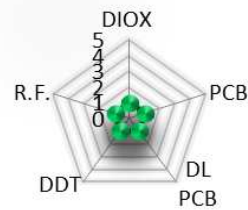
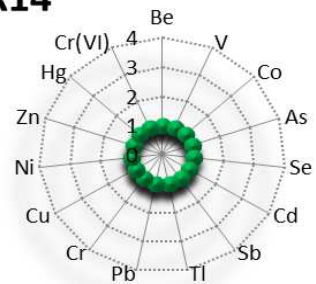


Figura 3.3.6. Grafici radar rappresentanti tutti i parametri biologici indagati nell'area di diffusione del cromo esavalente nelle acque superficiali

### **3.4 Conclusioni**

L'area descritta è stata teatro in passato della diffusione di cromo esavalente nelle acque sotterranee in ben due occasioni. Le analisi svolte sulle acque avevano presentato valori allarmanti del pericoloso inquinante. Data la pericolosità che caratterizza il cromo esavalente abbiamo deciso di verificare la sua presenza anche a livello di suoli.

Mancando una procedura analitica affidabile per la determinazione del cromo esavalente nel suolo, abbiamo deciso di condurre le analisi mediante un'innovativa e promettente tecnica, la diluizione isotopica. Essa infatti consente di fornire risultati accurati e precisi laddove le altre tecniche soffrivano di mancanze in questo senso a causa del manifestarsi di interconversioni fra le specie del cromo durante le varie fasi analitiche. Sempre nell'ottica di fornire risultati accurati anche la fase di estrazione ha visto l'applicazione di una tecnica recentemente messa a punto, che però necessitava di alcune migliorie. I campioni reali, infatti, subivano una totale riduzione del Cr(VI).

Dopo aver condotto una serie di prove sperimentali su campioni standard certificati e su campioni reali, abbiamo ottimizzato le condizioni di estrazione, cosa che ci ha permesso di stabilire il livello di contaminazione presente nell'area oggetto di indagine. Inoltre, i nostri studi hanno rivelato una correlazione tra la riduzione dello spike di  $^{53}\text{Cr(VI)}$  utilizzato e la presenza di ferro nella soluzione derivante dall'estrazione. Al fine di limitare questo fenomeno abbiamo altresì testato una serie di possibili soluzioni, cambiando il pH della soluzione di EDTA estraente, variandone la concentrazione ed aggiungendo un agente complessante per il ferro, la fenantrolina. Tuttavia le condizioni per la soluzione estraente individuate nel metodo originale si sono rivelate essere ottimali al fine di ottenere un'estrazione quantitativa di cromo esavalente.

Le nuove condizioni di estrazione individuate hanno consentito di abbassare il livello di riduzione dello spike di  $^{53}\text{Cr(VI)}$  al di sotto del 30%, condizione necessaria alla precisione del risultato. Grazie a ciò abbiamo potuto quantificare il Cr(VI) in tutti i nostri campioni, stabilendo che l'area esaminata non presenta contaminazione da cromo esavalente per quanto concerne i suoli. È emerso infatti che un solo punto supera il limite A, con un valore di  $2,40 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Per quanto riguarda in generali gli EPT e gli xenobiotici organici indagati occorre segnalare solo alcuni superamenti del limite tabellare A del D.Lgs. 152/06 in merito agli inorganici, ed un solo superamento dello stesso limite per la seconda categoria di sostanze in esame. Una particolarità di questa area è rappresentata dalla presenza dei ritardanti di fiamma, ben più elevati che in tutta l'area della regione.

Abbiamo potuto constatare che il sito CR2 presenta una netta differenza rispetto agli altri punti campionati a livello di concentrazioni di inquinanti, che non sembra però riflettersi negativamente sui parametri biologici, e quindi sulla salute del suolo.

Dal punto di vista biologico il quadro che emerge dai radar riassuntivi è buono, in quanto nella maggior parte dei siti campionati non emergono criticità. Solo in tre punti (CR8, CR10 e CR11) la maggior parte degli indicatori usati hanno restituito valori rientranti nella classe di giudizio media (colore arancio), situazione che non comporta in ogni caso allarme.

#### *BIBLIOGRAFIA*

[1] Allegato 5 degli allegati al Titolo 5 della Parte IV "Norme in materia di gestione dei rifiuti e di bonifica dei siti inquinati"; Decreto Legislativo del 3 aprile 2006 n. 152 "Norme in materia ambientale", aggiornato al 27 marzo 2010;

[2] "Natural Attenuation of Hexavalent Chromium in Groundwater and soils"; EPA, Environmental Assessment sourcebook, J. Russel Boulding; CAP 4;

[3] Unceta, N., Séby F., Malherbe, J., Donard, O.F.X., Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review, 2010;

[4] WHO Environmental Health Criteria 61, Geneva, 1988;

- [5] Dayan AD, Paine AJ, Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000, 2001;
- [6] Machle W, Gregorius V. Cancer of the respiratory system in the United States chromate-producing industry. Public Health Rep 1948; 63 : 1114-27;
- [7] Langard S. One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports. Am J Ind Med 1990; 17 : 189-215
- [8] NIOSH Manual of Analytical Methods, 2nd. ed., V. 1, P&CAM 169, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Publ. (NIOSH) 77-157-A (1977).
- [9] USEPA Method 3060A alkaline digestion for hexavalent chromium, revision 1 December 1996
- [10] Pettine, M., Capri, S., Digestion treatments and risks of Cr(III)-Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments – a review, 2005;
- [11] U.S. EPA Method 6800 elemental and speciated isotope dilution mass spectrometry, revision 0, February 2007;
- [12] EPA, Environmental Assessment Sourcebook, J. Russel Boulding, CAP 4, natural attenuation of hexavalent chromium in ground water and soils, Carl D. Palmer, Robert W. Puls;
- [13] Fabregat N., Rodriguez-Gonzalez, P.; Castillo, A.; Malherbe, J.; Roig Navarro, A.; Long, S.; Garcia Alonso, J. I.; Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry, 2012;
- [14] Hofman J, Bezchlebová J, Dušek L, Doležal L, Holoubek I, Anděl P, Ansorgová A, Malý S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. "Environment International", 2003, n.28, p.771-778.

## **CONCLUSIONI GENERALI**

Lo scopo del presente progetto è quello di valutare lo stato di salute e la qualità dei suoli della Regione Lombardia e di alcune specifiche aree, attraverso un monitoraggio multidisciplinare. I suoli campionati provenivano prevalentemente da aree dedicate ad attività agricola, e per operare tale selezione ci si è serviti di una preesistente rete di punti georeferenziati nota con il nome di LUCAS, e di altri database dai quali sono state ricavate informazioni territoriali che ci hanno permesso di costruire la nostra mappa di campionamento.

Tutto ciò ci ha fornito un disegno di punti distribuiti su tutto il territorio regionale, sul quale abbiamo lavorato con l'intento di ricavare una "fotografia" dello stato di fatto, il cosiddetto punto zero di un'opera che sarebbe auspicabile prolungare negli anni.

Dal generale siamo passati allo specifico, dalla selezione casuale di punti sull'intero territorio regionale alla creazione di schemi che consentissero di ricoprire al meglio i terreni circostanti un'attività particolarmente impattante la qualità ambientale, o superfici che oggetto in passato di importanti eventi di contaminazione. In questa tesi sono state portate ad esempio due delle sette aree indagate: un Sito di Interesse Nazionale e l'area di dispersione di cromo esavalente nelle acque sotterranee.

Per poter valutare al meglio le condizioni di un suolo occorre capire innanzitutto quali informazioni raccogliere.

I concetti di qualità e salute riferiti a terreni agrari si sono evoluti e distinti l'uno dall'altro nel corso degli anni. In passato essi avevano pressappoco lo stesso significato riferito prevalentemente all'ottenimento di una produzione agricola ottimale, e venivano determinati soprattutto in termini chimico-fisici. Oggi invece la componente vivente del suolo, in ogni sua sfaccettatura e categoria, diventa fondamentale alla comprensione delle condizioni di un terreno. Il suolo non è più un mero supporto ma un sistema strettamente connesso agli altri comparti ambientali, influenzato e caratterizzato da tutti gli organismi che lo compongono. Valutare le condizioni di tali componenti, in un'ottica appunto multidisciplinare, permette di valutare la sua salute. Gli indicatori biologici sono come dei "termometri".

Sulla base di tutto ciò abbiamo cercato di indagare un ampio numero di componenti biotiche del suolo, che ci consentissero di valutare al meglio le informazioni ottenute dal punto di vista chimico-fisico. Abbiamo anche avuto modo di applicare alcune tecniche che esulano dal classico monitoraggio, ma che ci forniscono qualche dettaglio in più circa il comportamento di una sostanza inquinante o di un elemento.

Dal punto di vista generale abbiamo qui presentato i dati ottenuti dalla caratterizzazione chimico-fisica dei 156 campioni prelevati e in particolare abbiamo confrontato le concentrazioni degli elementi potenzialmente tossici con i limiti tabellari imposti dalla legge di riferimento, il Decreto Legislativo 152 del 2006, individuando e cercando di motivare gli eventuali sforamenti. Per fare ciò è necessario anche capire l'evoluzione dei suoli, la loro origine, determinando di quale categoria essi facciano parte. Il Testo Unico Ambientale (D.Lgs. 152/2006) prevede due tipologie di limiti da applicare a terreni a destinazione d'uso verde pubblico e privato, oppure a suoli destinati ad attività industriali. Anche se non è ben chiaro in quale delle due categorie rientrino i terreni agricoli, il limite più restrittivo viene determinato considerando i valori di fondo naturale dei diversi elementi considerati. Uno sfornamento di questo limite è imputabile sia ad eventi naturali che non, mentre il limite più elevato sarebbe da collegare esclusivamente ad azione antropica.

In questa sede ci è sembrato però più interessante presentare i risultati ottenuti dalla determinazione dei quattro radionuclidi gamma emittenti, tre artificiali  $^{134}\text{Cs}$  e  $^{137}\text{Cs}$  e  $^{60}\text{Co}$ , e uno naturale,  $^{40}\text{K}$ . Per quanto riguarda i primi due, essi derivano dalla fissione nucleare, e ciò che li contraddistingue è il tempo di dimezzamento, ragione per cui il  $^{134}\text{Cs}$  è

completamente esaurito nei nostri suoli, mentre il  $^{137}\text{Cs}$  lo si ritrova circa dimezzato rispetto alle quantità accertate in seguito all'esplosione della centrale di Chernobyl nel 1986. Esso infatti impiega 30,17 anni a dimezzare la propria presenza. È stata notata una certa sua tendenza alla migrazione orizzontale, oltre che verticale, dovuta al ruscellamento e a fenomeni erosivi. Per quanto riguarda la migrazione verticale, invece, nei suoli agrari viene completamente alterata dalle lavorazioni agricole che tendono ad omogeneizzare la sua concentrazione nei primi trenta centimetri di profondità, condizione ben diversa da quella presente in terreni boschivi, dove l'accumulo nei primi strati comporta l'ingresso di tale elemento in organismi viventi quali la selvaggina. Entrambi gli isotopi del Cs derivano anche da test nucleari condotti nel corso degli anni, ed il fatto di non aver ritrovato nei nostri campioni il  $^{134}\text{Cs}$  conferma che nessun test o incidente si sia verificato recentemente nelle vicinanze della nostra area.

Altra conferma confortante deriva dalla totale assenza di  $^{60}\text{Co}$ , elemento usato in ambito ospedaliero. Generalmente la sua presenza in suoli naturali od agrari è legata all'abbandono illecito di rifiuti pericolosi.

Il radionuclide naturale  $^{40}\text{K}$  si trova distribuito in maniera ubiquitaria sul pianeta in relazione alla composizione dei suoli, alla tipologia del materiale di origine degli stessi e, come nel caso di suoli agricoli, in base alla fertilizzazione che si opera. Con il nostro lavoro abbiamo verificato la correlazione fra tale isotopo e la percentuale totale di potassio.

Negli altri due capitoli della tesi ci siamo invece dedicati a due delle sette aree del progetto che presentavano determinate criticità ambientali. In particolare in queste due zone – rispetto alle altre – oltre ad aver operato una valutazione coadiuvata dall'uso di indicatori biologici, abbiamo avuto modo di applicare due tecniche innovative: la diluizione isotopica e i biosaggi con batteri bioluminescenti.

La tecnica della diluizione isotopica applicata alla spettrometria di massa ci ha permesso di determinare la presenza di cromo esavalente in terreni provenienti da un'area dove in passato tale elemento si era diffuso nelle acque sotterranee. Si tratta di una forma ossidata del cromo che lo rende pericoloso dal punto di vista del contatto, dell'ingestione, ma soprattutto in seguito ad inalazione, attraverso la quale esplica la propria cancerogenicità. Visti i livelli elevati di contaminazione raggiunti dalle acque, il nostro scopo era quello di verificare la sua presenza anche nei suoli. Questo tipo di determinazione nelle matrici solide e complesso quali il suolo è però resa difficile dalle reazioni di interconversione che avvengono fra le diverse specie di cromo in fase estrattiva. La diluizione isotopica è l'unica delle tecniche sperimentate nel corso degli anni che permette di quantificare le interconversioni e di correggerle al fine di ottenere delle quantificazioni precise.

Oltre ad applicare la diluizione isotopica, nel nostro caso abbiamo anche verificato il funzionamento di una recente tecnica estrattiva ad essa abbinata, che grazie alla composizione della soluzione estraente consente di evitare l'ossidazione del cromo trivalente in tale fase, problema che inficiava la buona riuscita analitica in passato. Sempre grazie a questa tecnica estrattiva abbiamo potuto semplificare la procedura della diluizione isotopica. Tale metodo prevede di aggiungere al campione analizzato una quantità nota di una soluzione isotopicamente arricchita di un isotopo stabile dall'abbondanza naturale minore dell'elemento in esame. Ogni specie del cromo presente richiederebbe quindi l'aggiunta di uno "spike isotopicamente arricchito"; di conseguenza si tratterebbe di una analisi con "double spike". Il vantaggio della tecnica estrattiva applicata consiste nell'evitare l'ossidazione del cromo trivalente presente, necessitando della aggiunta di un solo spike per il Cr(VI).

L'applicazione di questa metodica ai nostri campioni di suolo reale, ha presentato il problema opposto: la riduzione del Cr(VI) a Cr(III). Ciò comportava quindi problemi di quantificazione, anche perché l'estrema riduzione delle soluzioni isotopicamente arricchite aggiunte escludeva la possibilità della buona riuscita della tecnica della diluizione isotopica, anche con l'uso della modalità double spike. Abbiamo così dovuto svolgere una serie di prove fino ad ottenere le



condizioni di estrazione ottimali per la quantificazione del cromo esavalente, limitando per quanto possibile le riduzioni dello spike e del Cr(VI) naturale. Nel contempo abbiamo deciso di indagare quali fossero le cause. Dalle ricerche bibliografiche è emerso che nelle nostre condizioni di lavoro i responsabili della riduzione del cromo potevano essere la sostanza organica contenuta nel terreno ed il ferro estratto. Proprio quest'ultimo sembra avere la maggior responsabilità, come risultato dalle correlazioni ottenute fra sua concentrazione e percentuale di riduzione presentata dai campioni. Dopo aver condotto ulteriori prove per cercare di limitare l'effetto riducente del ferro, intervenendo sulla composizione della soluzione estraente, abbiamo potuto constatare che le condizioni originali erano quelle che consentivano i migliori livelli di recupero rispetto alla concentrazione certificata dello standard usato come prova.

In conclusione è stato comunque possibile quantificare il cromo esavalente contenuto nei nostri campioni, che solo in un caso ha superato il livello tabellare A ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ), ragione per cui, unitamente al fatto che negli altri terreni la concentrazione era ben al di sotto, non è stato possibile imputare tale valore all'evento passato di contaminazione. Si può affermare che i suoli non siano contaminati da cromo esavalente.

La speciazione degli elementi è stato un tema importante di questa tesi. Essa è regolata da diversi parametri e fornisce informazioni più precise circa il reale impatto che alcuni elementi o sostanze possono avere. Per esempio oltre a possedere un diverso livello di tossicità, le varie forme di un elemento hanno anche diversa mobilità fra i comparti ambientali. La mobilità che gli elementi acquistano è il modo attraverso il quale essi possono divenire disponibili per le varie forme viventi.

La seconda area da noi presa in considerazione è stata da tempo dichiarata Sito di Interesse Nazionale a causa dell'elevata presenza di sostanze inquinanti, sia organiche che inorganiche. Ciò che è emerso dalle nostre analisi è che alcuni metalli pesanti sfiorano fino a tre volte il limite legislativo più elevato, quello per le destinazioni di uso industriale. Si tratta di mercurio ed arsenico. Per quanto riguarda i composti organici si hanno diossine, PCB, pesticidi clorurati fra cui DDT. Ovviamente questo sito è stato esulato dalle pratiche agricole e quindi tutti i terreni campionati si presentavano come incolti. Ciò che ci siamo posti di valutare era la mobilità di due degli elementi più presenti (As e Hg), e la biodisponibilità mediante l'uso di biosensori luminescenti prodotti ingegnerizzando *E.coli*.

Purtroppo nel caso dell'arsenico non abbiamo ottenuto risposta dal biosensore, mentre per il mercurio abbiamo avuto modo di verificare che l'emissione di luminescenza di tali organismi era direttamente proporzionale alla presenza dell'elemento in soluzione, che a sua volta era maggiore quanto più alta era la concentrazione nei suoli. Per l'arsenico invece i meccanismi di mobilitazione sono più complessi. Anche se non abbiamo avuto risposta dall'applicazione dei biosensori, nel caso di questo elemento abbiamo applicato una tecnica che prevede l'uso di dispositivi passivi noti come *diffusive gradient in thin films* (DGT). Si tratta di piccoli supporti di materiale plastico che contengono una resina a contatto con una membrana di idrogel. In seguito alla loro messa a contatto con il suolo si crea una diffusione dell'elemento in questione verso la resina che cattura l'elemento, che dopo un certo periodo di tempo viene recuperata per svolgere le analisi. Grazie a questa tecnica abbiamo potuto quantificare la concentrazione dell'arsenico passata in soluzione ed intrappolata nella resina, che è rappresentativa della quantità che dal suolo è in grado di passare alla soluzione liquida circolante. Inoltre, è stato possibile anche operare la speciazione dell'arsenico in tali campioni, attraverso l'accoppiamento della cromatografia liquida all'ICP-MS. Le specie determinate sono state quattro, due organiche e le due inorganiche, maggiormente presenti e più tossiche: As(III) e As(V). Fortunatamente quest'ultima forma era quella più rappresentata, essendo anche la meno tossica.

Sia per il mercurio che per l'arsenico i quantitativi in grado di acquistare mobilità verso il comparto acquoso superano sia i limiti previsti per le acque superficiali e sotterranee (D.Lgs. 152/2006), che quelli per le acque potabili (D.Lgs. n° 31 del 02/02/2001).

Oltre ad aver sperimentato l'applicazione delle due tecniche analitiche dei biosaggi e della diluizione isotopica, che hanno arricchito il progetto con informazioni ulteriori sulla mobilità e tossicità di elementi quali arsenico, mercurio e cromo esavalente, la fase finale del progetto è stata quella di assemblaggio delle varie informazioni ricavate attraverso i bioindicatori.

I parametri valutati riguardavano la genotossicità delle sostanze presenti nel suolo sfruttando il trifoglio come pianta indicatrice, la struttura e le caratteristiche delle comunità di lombrichi e protozoi ciliati, i parametri della comunità microbica e le attività enzimatiche del suolo. Sono stati inoltre condotti ulteriori saggi mediante l'applicazione di sensori bioluminescenti costituiti da cellule che hanno permesso di stimare la disponibilità degli inquinanti organici.

## **RINGRAZIAMENTI**

Al termine di questo lungo percorso vorrei ringraziare coloro che mi hanno aiutata, in particolar modo il Professor Gian Maria Beone, mio tutor e preziosa fonte di insegnamenti.

Ringrazio la Professoressa Franca Carini per il sostegno e la costante presenza, così come la Dottoressa Maria Chiara Fontanella, Paolo Lodigiani, Fabrizio Speroni e Riccardo Rossi.

Un grazie particolare va inoltre al meraviglioso gruppo di dottorandi, tecnici, ricercatori e professori del Dipartimento di Fisica e Chimica Analitica dell'Università di Oviedo, e soprattutto a Silvia Queipo Abad, Ignacio García Alonso e Pablo Rodríguez-González, per il grande aiuto, la pazienza e l'amicizia dimostrata.

Naturalmente grazie anche a tutti i gruppi che hanno collaborato alla realizzazione del progetto Soil Mapping, ad iniziare dal Dottor Roberto M Cenci, anima e accanito sostenitore di questa opera, alla Dottoressa Paola Steffan ed all'Ingegnere Elefanti della Regione Lombardia, per aver dato il via al progetto e per averlo costantemente seguito, a tutti i Professori e Dottori che hanno realizzato le varie fasi: Dott. Gunther Umlauf (CCR Ispra), Sandra Citterio (Università Bicocca, Mi), Antonietta La Terza (Università di Camerino), Gianluca Renzi (CRA di Roma), Flavio Fornasier (CRA di Gorizia), Edoardo Puglisi e Riccardo Rossi (UCSC Piacenza), Guenolà Peres (Università di Rennes, Francia).

Grazie anche ai ragazzi di AEIFORIA per la realizzazione della fase di campionamento.