Attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e alla progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole nel S.I.N. BRESCIA – CAFFARO
















RELAZIONE FINALE – FEBBRAIO 2019

A cura di

Simone Anelli

Pietro Iavazzo

Paolo Nastasio

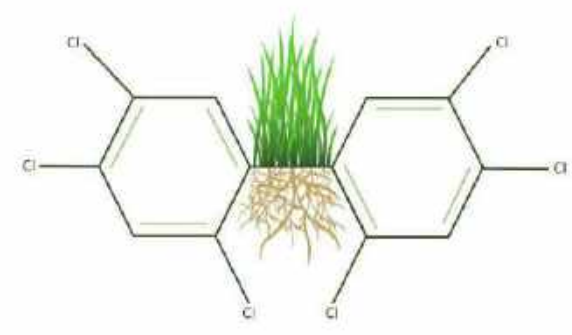
Vanna Maria Sale

Febbraio 2019

La tecnologia che,
legata alla finanza, pretende di essere l'unica soluzione
dei problemi, di fatto non è in grado di
vedere il mistero delle molteplici relazioni che
esistono tra le cose, e per questo a volte risolve
un problema creandone altri.

(Papa Francesco, Enciclica Laudato Si')

Questo lavoro è dedicato a tutti i bresciani, che hanno pagato, stanno pagando e pagheranno per i veleni fuoriusciti dalla Caffaro. Ma è dedicato soprattutto ai contadini, dentro e fuori il SIN, che dissetando i loro campi con l'acqua che credevano fonte di vita, incolpevolmente e inconsapevolmente l'hanno ferita. E alcuni di loro hanno dovuto subire, dopo anni di sudore, l'umiliazione più grande: vedere i propri campi incolti e improduttivi. Possa questo lavoro dar loro un po' di speranza e abbreviare la malattia delle loro terre.



PLANTS CLEAN BRESCIA

Sommario

1 Introduzione 5

2 Attività previste dall'Accordo di Programma del 2009 7

2.1 Sintesi del percorso amministrativo 7

2.2 Obiettivi dell'incarico 8

2.2.1 Obiettivi definiti dall'Accordo di Programma 8

2.2.2 Revisione delle superfici e della disposizione delle aree per le diverse azioni indicate nell'Accordo di Programma 8

2.2.3 Approvazione del progetto definitivo (ERSAF-2014) e ulteriori modifiche alle attività previste dall'AdP 10

2.3 Gruppo di Lavoro 12

2.3.1 ERSAF 13

2.3.2 Consulenti scientifici 14

2.3.3 Altri componenti del gruppo di lavoro 14

2.4 Attività Preliminari 14

2.4.1 Accordi con i proprietari e gli agricoltori per l'utilizzo dei loro terreni 14

2.5 Attività previste dall'AdP:

Fase 1, Azione A - Ripristino, mantenimento e gestione dei cotici erbosi 16

2.6 Attività previste dall'AdP:

Fase 1, Azione B - Sperimentazione di tecniche di bioremediation 18

2.6.1 Caratterizzazione chimica e microbiologica delle aree A, R e T 19

2.6.1.1 FASE 1) Identificazione dei contaminanti presenti 20

2.6.1.2 FASE 2) Verifica dell'andamento della contaminazione dei terreni lungo la profondità 21

2.6.1.3 FASE 3) Ricostruzione tridimensionale della contaminazione 22

2.6.1.4 Caratterizzazione microbiologica 24

2.6.2 Sperimentazione in serra 25

2.6.2.1 Inquadramento 25

2.6.2.2 Scelta delle piante e trattamenti da testare 26

2.6.2.3 Preparazione del terreno da utilizzare nei vasi 27

2.6.2.4 Conduzione della sperimentazione in serra 28

2.6.2.5 Campionamenti dei suoli e dei vegetali 28

2.6.2.6 Analisi chimiche 28

2.6.2.7 Validazione dei dati analitici 29
2.6.2.8 Risultati della sperimentazione in serra 31
2.6.2.9 Prove in campo 32

2.7 Attività previste dall'AdP:

Fase 1 - Azione C: Progettazione e realizzazione di aree boscate 35

3 Altre attività nel SIN "Brescia-Caffaro" 42

3.1 Ordinanze sindacali finalizzate all'imposizione di alcuni limiti all'utilizzo del territorio e allo svolgimento di attività agricole nel SIN "Brescia - Caffaro" 42

3.2 Progetto "Passaggio contaminanti nelle produzioni agricole" 43

3.3 Prove agronomiche di agricoltura conservativa 46

3.4 Attività di approfondimento su coltivazioni destinate alla produzione di biomasse 48

3.5 Progetto "Orto Sperimentale" in campo e "Studio delle polveri" sollevate da attività agricole 50

3.5.1 Progetto "Orto Sperimentale" in campo 50
3.5.2 "Studio delle polveri" sollevate da attività agricole 52

3.6 Rogge 53

3.6.1 Studio dei percorsi 53
3.6.2 Approfondimenti sulla storia irrigua delle aree agricole interne al SIN e valutazioni a seguito di indagini integrative su alcuni terreni 53
3.6.3 Relazioni con SOGESID 56

3.7 Considerazioni 57

4 Scenari futuri 59

4.1 Opzione "0" - Nessun intervento 61

4.2 Opzione "1" - Fitocontenimento 62

4.3 Opzione "2" - Ritorno alle attività agricole 64

4.4 Opzione "3" - Bosco 65

4.5 Opzione "4" - Bioremediation 68

5 Relazioni con istituzioni e cittadini 70

5.1 Incontri e rapporti con le istituzioni locali 70

5.2 Comitato scientifico ATS per la valutazione dei rischi ambientali per la salute 70

5.3 Tavolo tecnico Aree agricole Caffaro ____ 70

5.4 Attività RECONnet ____ 72

5.5 Coinvolgimento dei gruppi e comitati ambientalisti bresciani ____ 72

5.6 Attività di approfondimento scientifico ____ 73

5.6.1 Anno 2013 ____ 73

5.6.2 Anno 2014 ____ 73

5.6.3 Anno 2015 ____ 74

5.6.4 Anno 2016 ____ 75

5.6.5 Anno 2017 ____ 76

5.6.5.1 Convegno organizzato da ERSAF ____ 77

5.6.6 Anno 2018 ____ 77

ELENCO DELLE TAVOLE

1. Aree agricole del SIN
2. Reticolo delle rogge

ELENCO DEGLI ALLEGATI

1. Elenco dei mappali ad attuale destinazione agricola/forestale
2. Schede di dettaglio dei terreni delle aree A-R-T
3. Relazioni speciazione Arsenico
4. Relazioni speciazione Mercurio
5. Relazione tecnica di ISPRA

1 Introduzione

Questo documento rappresenta la Relazione Finale sulle attività svolte da ERSAF nelle aree agricole del SIN "Brescia-Caffaro" a partire dal 2013 fino alla fine del 2018, che si possono distinguere in due principali ambiti di intervento:

1. ***Attività previste dall'Accordo di Programma*** - l'incarico affidato ad ERSAF da Regione Lombardia, per la realizzazione delle attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole nel Sito di Interesse Nazionale di "Brescia-Caffaro", come definite all'art. 3, punto E, dell'Accordo di Programma del 2009 (di seguito "AdP") sottoscritto dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (di seguito "MATTM"), Regione Lombardia, Provincia di Brescia, Comune di Brescia, Comune di Castegnato e Comune di Passirano per la definizione degli interventi di messa in sicurezza e successiva bonifica nel Sito di Interesse Nazionale di "Brescia-Caffaro";

2. ***Altre attività nel SIN "Brescia-Caffaro"*** - le diverse attività collaterali nate su incarico del Commissario Straordinario per il SIN "Brescia-Caffaro" (di seguito "Commissario") riguardanti lo studio di diversi aspetti legati allo svolgimento di attività agricole in un sito contaminato come quello di "Brescia-Caffaro".

Il documento illustra inoltre le relazioni intercorse in questi anni con i diversi soggetti coinvolti nella problematica: altri enti, istituzioni, associazioni di categoria, agricoltori e cittadini.

Infine, anche su sollecitazione del Commissario, mettendo a frutto le conoscenze acquisite in questi anni di lavoro e le riflessioni scaturite dalla partecipazione a diversi tavoli di lavoro e dal confronto con diversi soggetti, che crediamo ci abbiano permesso di avere una visione sufficientemente ampia, approfondita e imparziale della problematica, è stato inserito un capitolo, il quarto, che vuole rappresentare sinteticamente i possibili scenari che è possibile ipotizzare per il futuro prossimo delle aree agricole del SIN Caffaro, cercando per ciascuno di essi di evidenziarne i principali vantaggi e svantaggi.

Contestualmente alla presente Relazione vengono consegnati altri 2 documenti (con i relativi allegati, ove presenti):

1. *Protocollo operativo per la progettazione di interventi di bonifica con tecniche di bioremediation sui terreni delle aree agricole del SIN Brescia-Caffaro;*
2. *Linee guida scientifiche per la bonifica biologica delle zone agricole del SIN Brescia-Caffaro (a cura dei Consulenti scientifici).*

2 Attività previste dall'Accordo di Programma del 2009

2.1 Sintesi del percorso amministrativo

Il 29 settembre 2009 è stato sottoscritto l'Accordo di Programma tra il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, la Regione Lombardia, la Provincia di Brescia, il Comune di Brescia, il Comune di Castegnato e il Comune di Passirano per la definizione degli interventi di messa in sicurezza e successiva bonifica nel Sito di Interesse Nazionale di "Brescia-Caffaro".

Nella VI riunione del Comitato di indirizzo e controllo per la gestione dell'Accordo di Programma, tenutasi in data 9 novembre 2012, Regione Lombardia è stata individuata (in sostituzione del Comune di Brescia) quale soggetto attuatore dell'intervento di cui all'articolo 3, lettera E dell'Accordo stesso che prevede l'avvio degli interventi di messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole nel Sito di Interesse Nazionale di "Brescia-Caffaro".

Regione Lombardia, con nota prot. T1.2013.0005485 del 14/03/2013, ha affidato ad ERSAF l'incarico per la realizzazione delle attività di cui sopra; tale incarico prevedeva il termine delle attività al 31/12/2016.

A fine 2014 ERSAF ha trasmesso al MATTM il progetto definitivo "Avvio degli interventi di messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole del SIN Brescia – Caffaro del Comune di Brescia", valutato nelle Conferenze di Servizi istruttoria e decisoria rispettivamente del 10 dicembre e del 16 dicembre 2014; quest'ultima Conferenza ha preso atto del progetto valutandolo positivamente.

A seguito della nota di ERSAF prot. ERSAF.2014.0017600 del 06/11/2014, con cui è stata chiesta a Regione Lombardia una rimodulazione dei tempi di attuazione delle attività nel SIN "Brescia-Caffaro", è stato stipulato un primo atto aggiuntivo alla lettera d'incarico, sottoscritto in data 10/03/2015, che ha posticipato al 31/12/2017 il termine per la conclusione del progetto.

Regione Lombardia, con decreto n. 16302 del 18/12/2017 della D.G. Ambiente, Energia e Sviluppo Sostenibile, accogliendo la richiesta di proroga formulata da ERSAF con propria nota prot. ERSAF.2017.0010994 del 11/07/2017, ha approvato un secondo atto aggiuntivo alla lettera d'incarico con cui è stata concessa una proroga di un anno, dunque fino al 31/12/2018, per la conclusione del progetto da parte di ERSAF.

2.2 Obiettivi dell'incarico

2.2.1 Obiettivi definiti dall'Accordo di Programma

Le attività oggetto dell'incarico hanno riguardato specificatamente le aree agricole del SIN Brescia-Caffaro e si sono articolate secondo lo schema previsto al punto E) dell'AdP del 2009, di seguito riportato:

- FASE 1

Avvio degli interventi di messa in sicurezza di emergenza delle aree agricole su una superficie totale coinvolta pari a circa 100* ettari, secondo le seguenti azioni:

- *AZIONE A) Crescita superficie erbosa su una superficie di circa 84* ettari;*
- *AZIONE B) Sperimentazione di tecnologie di bioremediation per tre lotti di circa 5 ettari per una superficie totale di intervento pari a circa 15* ettari;*
- *AZIONE C) Piantumazione di un bosco planiziale padano per una superficie complessiva di 6,65* ettari.*

- FASE 2

Progettazione degli interventi di bonifica dei terreni delle aree agricole oggetto delle misure di messa in sicurezza di emergenza di cui alla Fase 1.

2.2.2 Revisione delle superfici e della disposizione delle aree per le diverse azioni indicate nell'Accordo di Programma

Si rende qui necessario fare alcune puntualizzazioni circa i dati, indicati dall'Accordo di Programma, relativi alle superfici delle aree agricole e delle aree oggetto delle diverse azioni (A, B e C) previste dallo stesso AdP.

Fin dalle prime valutazioni ERSAF ha notato come sia alcuni valori di superficie sia localizzazioni specifiche indicati dall'AdP non trovassero riscontro nello stato di fatto reale delle aree. Di seguito si riporta un quadro della situazione più preciso, basato sia su elaborazioni cartografiche sia sull'analisi dell'uso del suolo attuale.

* Queste sono le superfici così come indicate nell'Accordo di Programma. Una rivalutazione delle stesse è stata fatta da ERSAF, come riportato al par. 2.2.2

La superficie racchiusa nel perimetro delle aree agricole interne al SIN è pari a 97,39 ha.

Rispetto a questa superficie totale bisogna considerare che l'area è caratterizzata dalla presenza di numerose aree residenziali, commerciali e industriali nonché da una rete di infrastrutture viarie, per cui alla fine il conteggio della superficie agricola totale vera e propria è stata calcolata pari a 64,2 ha (Tavola 1).

La suddetta superficie deriva dalla sommatoria dei mappali catastali che, sulla base di una approfondita verifica sul campo, sono risultati effettivamente attribuibili all'utilizzo agricolo/forestale; l'elenco dei mappali ad attuale destinazione agricola/forestale è riportato nella tabella in Allegato 1.

Da questa nuova stima appare evidente come in particolare il dato, pari a 84 ha, indicato per lo sviluppo dell'azione A fosse irrealistico.

Per quanto riguarda l'azione B, come verrà dettagliatamente spiegato nel par. 2.6, tutta una serie di valutazioni hanno portato a scegliere 3 aree solo in parte coincidenti con quelle previste dall'AdP; queste aree sono state oggetto di una caratterizzazione di dettaglio e in una di esse, limitatamente a una superficie di circa 0,7 ettari, è stata realizzata una prova in pieno campo.

Inoltre, per quanto riguarda l'azione C (vedi par. 2.7), ERSAF aveva proposto fin dalla presentazione del Progetto definitivo 2014 un diverso approccio rispetto a quanto previsto dall'AdP: si era fatto notare in particolare come il disegno dell'area prevista per la creazione del nuovo bosco fosse particolarmente approssimativo, ricadendo in parte su superfici urbanizzate e in parte su boschi già esistenti, realizzati proprio da ERSAF (allora Azienda Regionale delle Foreste) verso la fine del secolo scorso. Gli interventi di ERSAF sono dunque consistiti nella realizzazione di rimboschimenti su aree scelte sulla base di criteri tecnici oltre che di disponibilità da parte della proprietà.

Per tutti i motivi sopra citati, le superfici sulle quali ERSAF è effettivamente intervenuto per le diverse azioni dell'AdP si discostano da quelle originariamente previste dall'AdP stesso, e sono riportate nella tabella seguente.

Tabella 1: superfici sulle quali ERSAF è effettivamente intervenuto per le diverse azioni dell'AdP

AZIONI	SUPERFICIE (ha)
AZIONE A) Crescita superficie erbosa	48,2 ha
AZIONE B) Sperimentazione di tecnologie di bioremediation	19,5 ha
AZIONE C) Piantumazione di un bosco planiziale padano	6,8 ha

La somma delle superfici delle 3 azioni nella tabella 1 è superiore alla superficie agricola totale pari a circa 64 ha in quanto vi è una parziale sovrapposizione delle superfici, considerato che alcune sono state interessate da più di un'azione.

2.2.3 Approvazione del progetto definitivo (ERSAF-2014) e ulteriori modifiche alle attività previste dall'AdP

Dopo aver discusso con la DG AESS di Regione Lombardia le modalità autorizzative del progetto per la realizzazione delle fasce boscate di cui all'azione C di Fase 1, il MATTM ha ritenuto necessario che il progetto definitivo relativo a tutte le attività oggetto dell'incarico venisse discusso nella Conferenza di Servizi che il MATTM stesso avrebbe convocato entro la fine del 2014.

È stato pertanto predisposto il progetto definitivo, trasmesso a tutti i soggetti pubblici e privati convocati dal MATTM per la Conferenza di Servizi istruttoria (svoltasi il 10 dicembre 2014). Durante l'incontro non sono emerse criticità da parte dei soggetti convocati, salvo la formulazione, all'interno del verbale della CdS, di due prescrizioni relative all'azione B che hanno richiamato ERSAF a:

1. chiarire, con successiva documentazione sugli stati di avanzamento, i dettagli della sperimentazione (con particolare riferimento al possibile uso di funghi, inoculi batterici, etc.) e verificare che gli interventi siano rispondenti a quanto previsto nell'AdP;
2. verificare, nel corso della sperimentazione, i percorsi di degradazione e la formazione di prodotti intermedi con proprie caratteristiche di tossicità e mobilità, con particolare attenzione:
    - alla esecuzione di bilanci di massa che consentano di identificare tutti, o la gran parte, dei prodotti di trasformazione in modo tale da ottenere una chiara indicazione sullo stato di qualità dei suoli nel corso ed al termine del trattamento, considerando anche la ripartizione dei contaminanti nelle specie vegetali impiantate, per una globale comprensione del destino dei contaminanti durante gli interventi;
    - alla contaminazione da mercurio, presumibilmente poco influenzata dalla bioremediation, ma che potrebbe interagire con le specie vegetali impiantate attraverso l'apparato radicale.

Nella Conferenza di servizi decisoria del 16 dicembre 2014 è stato dunque preso atto del progetto definitivo presentato da ERSAF. Il successivo decreto del MATTM (5565/TRI/B del

19/12/2014) ha approvato il verbale della Conferenza di servizi ribadendo la formulazione delle due prescrizioni relative all'azione B.

In risposta alle suddette prescrizioni ERSAF, dopo attenta discussione in seno al Gruppo di Lavoro congiunto tra ERSAF e le Università consulenti, maturata anche alla luce del primo anno di sperimentazione in serra effettuato, ha comunicato (lettera Prot. ERSAF.2016.0000433 del 14/01/2016) la piena condivisione dei loro contenuti ed obiettivi ma ha altresì evidenziato come il rispetto e la piena attuazione della prescrizione n. 2 *"comportano necessariamente un impegnativo aggravio in termini di studio e approfondimento scientifico, aumento della numerosità delle determinazioni analitiche e dunque conseguentemente anche di risorse necessarie"*.

La lettera ha sottolineato inoltre come il progetto di ERSAF presentato e positivamente valutato fosse calibrato sulle risorse individuate nell'Accordo di Programma del 2009 per le azioni di cui al punto E, insufficienti a coprire i costi derivanti dall'approfondimento analitico richiesto dalle prescrizioni di cui sopra, e ha chiesto pertanto che venisse valutato il piano dell'indagine di approfondimento chimico e microbiologico allegato alla lettera, predisposto dai consulenti scientifici allo scopo di dare risposta alla prescrizione, la cui attuazione era subordinata alla possibilità di poter disporre di ulteriori risorse.

La presa d'atto del MATTM ha autorizzato ERSAF a perseguire la realizzazione delle attività oggetto dell'incarico in coerenza al progetto definitivo, e quindi a discostarsi, laddove indicato, dall'Accordo di Programma. In particolare il progetto definitivo ha voluto chiarire subito l'approccio che si intendeva seguire per la stesura, nella parte finale dell'incarico, del "Progetto di bonifica" dei terreni del SIN Brescia-Caffaro. Era stato pertanto condiviso che il progetto avrebbe tenuto conto delle indicazioni che sarebbero emerse dal nuovo regolamento per le aree agricole, che allora sembrava in procinto di essere emanato, e che pertanto il progetto avrebbe avuto i connotati di un "piano di gestione agricola delle aree", indicando eventuali tipologie di coltivazione laddove ritenute compatibili con la presenza della contaminazione sulla base della verifica del rischio.

Nel marzo 2015 è stato sottoscritto tra ERSAF e DGAESS un Atto aggiuntivo alla lettera d'incarico ad ERSAF per la realizzazione delle attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni nelle aree agricole nel Sito di Interesse Nazionale di Brescia – Caffaro, come definito all'art. 3, punto E del relativo Accordo di Programma.

Tale atto si è reso necessario per formalizzare le modifiche apportate all'articolazione delle attività come prevista nella lettera d'incarico (protocollo Regione Lombardia T1.2013.0005485 del 14 marzo 2013), modifiche già esaminate in Conferenza di Servizi col MATTM (presa d'atto e approvazione in CdS decisoria del 16.12.2014).

Le modifiche hanno riguardato principalmente l'aggiunta di un anno alla durata delle attività oggetto dell'incarico, per la necessità di eseguire una caratterizzazione tridimensionale della contaminazione preliminare all'impostazione della sperimentazione di biorimedio nelle aree del SIN ad essa destinate, il cui termine è slittato pertanto dal dicembre 2016 al dicembre 2017, e la conseguente necessità di adeguare al nuovo crono-programma l'erogazione dei pagamenti previsti, stante la conferma delle risorse economiche stanziate nell'Accordo di Programma.

Tali modifiche hanno comportato lo slittamento al 2015 della sperimentazione in origine prevista per il 2014. Il biennio 2015 - 2016 ha visto l'attuazione di una sperimentazione in vaso (originariamente non prevista), mentre la sperimentazione in campo è stata avviata nel 2016 ed è proseguita nel 2017 e 2018.

Infine, a seguito di problemi nella validazione dei dati analitici relativi alla sperimentazione in vaso (vedi par. 2.6.2.7), si è reso necessario chiedere un'ulteriore proroga dell'incarico, che Regione Lombardia ha concesso con decreto n. 16302 del 18/12/2017 e che ha fissato al 31/12/2018 il termine per la conclusione di tutte le attività.

2.3 Gruppo di Lavoro

ERSAF ha avuto il ruolo di dirigere e coordinare tutto il progetto, inoltre ha gestito tutta la parte amministrativa e ha condotto direttamente numerose attività di campo. Per fare questo si è avvalso di diverse professionalità al suo interno fra cui agronomi, forestali e geologi.

Al fine di condurre con criteri rigorosamente scientifici la sperimentazione di tecniche di biorimedio ERSAF ha ritenuto inoltre di avvalersi della consulenza di esperti di livello universitario.

In particolare ERSAF ha sottoscritto con il Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia (in seguito DSAT) dell'Università degli Studi dell'Insubria un accordo quadro "*per la realizzazione di attività nell'ambito della ricerca del destino ambientale delle sostanze organiche e della microbiologia ambientale*" (delibera ERSAF n. III/12 del 26.09.2013). L'attuazione di tale atto è avvenuta mediante la sottoscrizione di un accordo di collaborazione finalizzato alla realizzazione di ricerche sul destino ambientale delle sostanze organiche e sulla microbiologia

ambientale (decreto del Direttore n. III/5426 del 09.12.2013). I referenti scientifici per il DSAT sono il prof. Antonio Di Guardo, per gli aspetti relativi al destino ambientale dei contaminanti, e la prof.ssa Elisabetta Zanardini, per gli aspetti legati alla microbiologia ambientale; a questi si aggiungono la prof.ssa Cristiana Morosini, esperta di bonifiche di siti contaminati, e la dott.ssa Elisa Terzaghi, assegnista di ricerca presso il gruppo guidato dal prof. Di Guardo.

Con la stessa deliberazione è stato inoltre approvato un accordo di collaborazione con il Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (in seguito DeFENS) dell'Università degli Studi di Milano, finalizzato all'approfondimento del ruolo della microbiologia ambientale sul biorisanamento delle matrici ambientali. Il referente scientifico di tale accordo è la prof.ssa Sara Borin, coadiuvata dalla dott.ssa Francesca Mapelli e dal dott. Lorenzo Vergani.

I consulenti scientifici hanno collaborato, in sinergia fra loro e col gruppo di lavoro ERSAF, all'approfondimento dei seguenti temi

- ✓ *studio del destino ambientale e trasformazione nel tempo della miscela di contaminanti presenti nel SIN, in particolare PCB, diossine/furani;*
- ✓ *messa a punto di metodi e modelli predittivi, tecniche biologiche e un monitoraggio microbiologico in grado di valutare il ruolo della biomassa vegetale e la potenzialità ed il ruolo della componente microbica associata all'apparato radicale delle piante nel ridurre la contaminazione nel tempo.*

Infine, nell'ambito dell'accordo intercorrente col DSAT di UNINS, è stato coinvolto, per gli aspetti geostatistici, il *prof. Giuseppe Raspa*, dell'Università Sapienza UNIROMA.

L'elenco delle persone che sono state coinvolte nel progetto durante tutta la durata dello stesso è rappresentato nei paragrafi seguenti.

2.3.1 ERSAF

Per ERSAF:

- *dott. for. Paolo Nastasio* (responsabile del progetto)
- *dott.ssa geol. Vanna Maria Sale*
- *dott. agr. Simone Anelli*
- *dott. for. Adriano Prandelli*
- *dott.ssa Alice Tanfoglio*
- *dott. agr. Pietro Iavazzo*

2.3.2 Consulenti scientifici

Università degli Studi dell'Insubria:

- *prof. Antonio Di Guardo*
- *prof.ssa Elisabetta Zanardini*
- *prof.ssa Cristiana Morosini*
- *dott.ssa Elisa Terzaghi*

Università degli Studi di Milano:

- *prof.ssa Sara Borin*
- *dott.ssa Francesca Mapelli*
- *dott. Lorenzo Vergani*

Sapienza Università di Roma:

- *prof. Giuseppe Raspa*

2.3.3 Altri componenti del gruppo di lavoro

Regione Lombardia - Direzione Generale Ambiente e Clima:

- *ing. Paolo Casciano*

Comune di Brescia:

- *dott. Stefano Armiraglio*
- *dott. Nunzio Pisano*

2.4 Attività Preliminari

2.4.1 Accordi con i proprietari e gli agricoltori per l'utilizzo dei loro terreni

Nel 2013, all'inizio del proprio operato, ERSAF si è trovato ad affrontare una situazione particolarmente complessa. Si ricorda che la quasi totalità delle aree agricole all'interno del SIN sono di proprietà privata e pertanto, per poter fare degli interventi sul territorio, è stato necessario cercare di creare un rapporto di fiducia con tutti i soggetti coinvolti al fine di stringere degli accordi di collaborazione; il compito è stato particolarmente gravoso poiché inizialmente, anche in relazione al tempo trascorso dalla prima ordinanza, pari a oltre un

decennio, la diffidenza dei residenti era palpabile ed ha reso molto faticoso far loro comprendere l'opportunità rappresentata dall'adesione al progetto di ERSAF.

La fase di inserimento sul territorio e allaccio di rapporti con i proprietari è durata per circa un anno: con i proprietari e gli agricoltori della zona si sono svolti numerosissimi incontri, circa una ventina, per far loro comprendere le azioni che si intendevano attuare sui terreni di loro proprietà o in conduzione alle aziende agricole e ottenerne il consenso, mediante sottoscrizione di un accordo scritto, alla realizzazione delle azioni previste dall'AdP.

Col passare del tempo la presenza di ERSAF sul territorio è stata vista sempre più in modo positivo tant'è che negli anni il numero di accordi sottoscritti è aumentato. Di seguito una tabella riepilogativa con il numero degli accordi sottoscritti e le superfici interessate, distinti per tipologia di azione.

Tabella 2: schema riassuntivo degli accordi con le proprietà e relative superfici interessate

TIPOLOGIA DI AZIONE		2014	2015	2016	2017	2018
A) PRATI trinciatura	n. accordi	17	19	19	19	19
	sup. (ha)	37,56	39,71	39,71	39,71	39,71
B) BIORIMEDIO sperimentazione	n. accordi	2	5	5	5	4
	sup. (ha)	7,80	19,51	19,51	19,51	12,90
C) BOSCHI rimboschimenti e miglioramenti forestali	n. accordi	3	6	6	6	6
	sup. (ha)	4,61	6,8	6,8	6,8	6,8
TOT. SUPERFICIE AGRICOLA INTERESSATA DA ACCORDI	**n. accordi**	**22**	**30**	**30**	**30**	**29**
	sup. (ha)*	**45,38**	**54,38**	**54,38**	**54,38**	**54,38**

* Le superfici totali per anno non corrispondono alla somma delle superfici relative alle 3 azioni (dello stesso anno) in quanto vi sono alcune sovrapposizioni cioè uno stesso mappale è stato interessato da più azioni.

2.5 Attività previste dall'AdP: Fase 1, Azione A - Ripristino, mantenimento e gestione dei cotici erbosi

Questa azione prevedeva la crescita di una superficie erbosa di qualità e/o il mantenimento in uno stato ottimale delle superfici prative in tutti i terreni all'interno del perimetro delle aree agricole del SIN non oggetto delle azioni di cui ai punti 2.6 e 2.7.

Per tale azione è stato elaborato un accordo di collaborazione con i proprietari/affittuari dei terreni, valido inizialmente nel triennio 2014 - 2016 e poi rinnovato anche per il 2017 e 2018, che ha previsto l'effettuazione di 2/3 sfalci all'anno al fine di rinnovare le superfici erbose, favorirne l'infittimento mediante stimolazione dell'accestimento e contenere lo sviluppo di specie infestanti. Le indicazioni predisposte da ERSAF, operative dal 2014 ed eseguite dall'impresa di servizi *Dassè Fausto Agromeccanica Conto Terzi*, hanno previsto la trinciatura medio/fine (circa 5 cm) del materiale vegetale presente, per favorire i processi di decomposizione e mineralizzazione del materiale vegetale lasciato sul campo e nel contempo inibire fenomeni di formazione di feltro dovuti al compattamento di cospicue masse di materiale vegetale. È stato inoltre espressamente prescritto che il taglio della vegetazione avvenisse a un'altezza di circa 10 cm da terra, per evitare il più possibile il contatto della macchina operatrice con il terreno e il conseguente sollevamento di polveri. Le attività connesse alla gestione dei cotici erbosi sono consistite principalmente nella regolare pulizia delle rogge perimetrali e dei fossi adacquatori invasi dallo sviluppo di vegetazione.



Figura 1: trinciatura dei prati

All'inizio dell'attività, nel 2014, a causa della situazione di abbandono in cui versavano alcune aree, ove era evidente lo sviluppo di vegetazione arbustiva ed una prima fase di colonizzazione arborea, è stato necessario procedere preventivamente con operazioni di decespugliamento meccanico e anche con il taglio manuale delle piante di maggiore dimensione. Il materiale legnoso derivante da quest'ultima operazione è stato cippato mediante noleggio a caldo di apposita attrezzatura e il materiale cippato è stato sparso sui prati.

È stato inoltre necessario procedere allo smantellamento di alcuni orti abusivi situati in prossimità del confine nord orientale del perimetro delle aree agricole del SIN, la cui presenza è stata riscontrata durante le prime ricognizioni in campo. L'attività è stata condotta, alla presenza di agenti di Polizia Locale, in stretta intesa con il Comune di Brescia e con la proprietà (società Imbozza e Villa Baiana), mediante l'affidamento di tale servizio alla ditta *Agritre di Giugno Gianpaolo e F.lli Snc,* che esegue lavori agricoli e forestali.

L'operazione di smantellamento ha avuto luogo il giorno 24/06/2014; successivamente si è reso necessario ripetere l'operazione una seconda volta, in data 25/01/2018, a seguito del ritrovamento di una situazione analoga sempre all'interno della stessa proprietà.

Nel complesso per questa azione sono stati sottoscritti per il 2014 n. 17 accordi che a partire dal 2015 sono saliti a 19; la maggior parte di essi aveva una durata triennale mentre per alcuni la durata era annuale ed è stato dunque necessario rinnovarli di anno in anno.

Va segnalato che a fronte della buona adesione agli accordi, preceduta e accompagnata da una continua presenza sul territorio al fine di riconquistare la fiducia nelle istituzioni deteriorata da anni di assenza, un ristretto numero di proprietari (5) ha scelto di non aderirvi, optando per la realizzazione in proprio delle attività di cura e manutenzione dei terreni posseduti o condotti ed impegnandosi pertanto ad effettuare direttamente le operazioni di trinciatura.

A fronte di quanto previsto dall'AdP, ovvero dell'effettuazione degli interventi di gestione dei cotici erbosi per due anni, ERSAF è riuscito, mediante un oculato impiego dei fondi disponibili, a eseguire l'attività di fitocontenimento per l'intero quinquennio 2014 - 2018.

Si evidenzia l'importanza di trovare modalità e risorse per poter garantire il proseguimento dell'attività fintanto che non verrà individuata la destinazione futura dell'area (vedere il cap. 4 - Scenari futuri).

Il quadro riassuntivo dello svolgimento di questa azione sul territorio è riportato in Tavola 2.

2.6 Attività previste dall'AdP: Fase 1, Azione B - Sperimentazione di tecniche di bioremediation

Questa azione prevedeva la sperimentazione di tecniche di bioremediation su una superficie complessiva di 15 ha, al fine di valutare l'efficacia di rimozione dei contaminanti ritenuti prioritari nell'area (PCB, PCDD/F e mercurio) e di valutare le possibili applicazioni di tali tecnologie su larga scala alle aree agricole incluse nel perimetro del SIN.

La scelta delle aree effettive dove attuare la sperimentazione è stata da ERSAF in parte variata rispetto all'AdP (vedi figura 2) in quanto si è dovuto tenere conto dei seguenti elementi:

a) disponibilità dei proprietari/conduttori a rendere disponibili i loro fondi e conseguente stipula di accordi con loro, cercando di costituire unità omogenee per cui ad un lotto di sperimentazione corrispondesse la gestione di un'unica azienda agricola;

b) assenza di vincoli legati a infrastrutture, sviluppo urbanistico, manufatti, condizioni attuali della vegetazione (alcune zone stavano naturalmente modificandosi verso uno stadio evolutivo a bosco);

c) possibilità di avere accesso ad una fonte di approvvigionamento di acqua per poter irrigare le colture (non essendo possibile utilizzare il sistema delle rogge in quanto con ordinanza sindacale queste sono state escluse dal reticolo idrico della zona);

d) effettivo livello di contaminazione con riferimento ai tre parametri oggetto di studio. In particolare una delle aree indicate nell'allegato 3 dell'AdP aveva una storia irrigua molto diversa dagli altri due, con alta probabilità di grosse differenze relativamente ai livelli di contaminazione, come poi effettivamente riscontrato nelle indagini integrative realizzate da ERSAF nel 2018 (vedi par. 3.5.2).



Figura 2: confronto fra le 3 aree indicate per l'azione B dall'AdP (a sx) e quelle individuate da ERSAF (a dx)

Sono state quindi individuate le tre aree destinate alla sperimentazione, coincidenti con i terreni di tre aziende agricole, di un privato e della società Rete Ferroviaria Italiana, e sono stati sottoscritti con i proprietari/agricoltori n. 5 accordi per avere il consenso a utilizzare i loro terreni.

La scelta, presa in accordo con i consulenti scientifici dopo approfondite valutazioni, è stata quella di far precedere alla sperimentazione in campo una sperimentazione in mesocosmo (vasi di circa 6 l di volume), che permettesse di ottenere risultati perfettamente comparabili e in condizioni controllate, dunque estremamente solidi da un punto di vista scientifico in vista dell'applicazione in pieno campo della tecnologia.

L'attuazione della sperimentazione in vaso, inizialmente prevista per il 2014, è slittata di un anno per la necessità, emersa dal confronto con i consulenti scientifici del progetto, di acquisire ulteriori elementi di conoscenza necessari alla sua impostazione, in particolare l'esigenza di definire in modo approfondito il quadro ambientale entro il quale si sarebbe andati ad operare, relativamente agli aspetti di caratterizzazione chimica e microbiologica dei terreni interessati (si veda il paragrafo successivo, 2.6.1). Tali approfondimenti sono stati ritenuti fondamentali per garantire il massimo rigore scientifico e dare attendibilità agli studi, alle tesi e ai risultati che si sarebbero ottenuti da questo progetto.

2.6.1 Caratterizzazione chimica e microbiologica delle aree A, R e T

Al momento dell'impostazione della sperimentazione la conoscenza scientifica del SIN era per molti aspetti lacunosa, considerato che l'unica caratterizzazione chimica effettuata sulle aree agricole era stata realizzata da ARPA Lombardia negli anni 2002/2003. Tale caratterizzazione non poteva fornire informazioni aggiornate e, soprattutto, puntuali delle aree di interesse sia per il fatto di essere ormai datata, sia perché realizzata con strumenti analitici ormai superati, sia infine perché la modalità di campionamento utilizzata non era adatta alla scala di dettaglio necessaria per le sperimentazioni.

Anche informazioni sulla componente microbiologica dei terreni delle aree agricole ricadenti nel SIN Caffaro erano completamente assenti, in particolare sui microrganismi con potenziale degradativo nei confronti dei PCB. Dato che le prove di biorimedio che si intendevano sperimentare vedevano come componente fondamentale proprio i microrganismi indigeni del terreno, si è ritenuto necessario eseguire preliminarmente alla realizzazione delle parcelle in campo una accurata caratterizzazione anche microbiologica delle aree oggetto di studio.

Per tutti questi motivi si è ritenuto che una nuova caratterizzazione sia chimica sia microbiologica fosse fondamentale per poter stabilire quali tecnologie potessero avere possibilità di successo nel biorimedio sito specifico, e dunque nell'indirizzare la scelta delle tecnologie più opportune da provare con le sperimentazioni.

Si è dunque impostata una nuova caratterizzazione chimica e microbiologica, realizzata per fasi come di seguito descritto, nelle tre aree A, R e T.

2.6.1.1 FASE 1) Identificazione dei contaminanti presenti

Questa prima fase si è basata sul prelievo e l'analisi di 3 campioni compositi rappresentativi delle tre aree di sperimentazione A, R e T mediante prelievi in superficie e in profondità secondo una maglia aleatoria stratificata.

Ogni area è stata suddivisa in 15 maglie regolari; all'interno di ciascuna maglia si è scelto un punto a caso, georeferenziato, in corrispondenza del quale sono stati effettuati due prelievi a carotaggio alle profondità 0-20 cm e 50-70 cm. I 15 diversi punti di prelievo entro ogni area hanno fornito i 30 sub-campioni (considerati i 2 intervalli di profondità) che sono stati miscelati in un unico campione composito rappresentativo di ciascuna area.

I 3 campioni compositi rappresentativi delle tre zone di sperimentazione sono stati sottoposti a determinazioni qualitative, i cui risultati hanno permesso di ottenere un quadro esaustivo delle tipologie di composti presenti nei terreni, evidenziando la presenza di classi di contaminanti fino a quel momento non indicate per quelle aree, e compilare di conseguenza una lista di contaminanti prioritari da analizzare sui campioni delle indagini successive. Sono stati misurati circa 80 congeneri di PCB, utili per ricostruire il fingerprint della contaminazione (prevalentemente medio/alto clorurati, quindi più persistenti); sono stati misurati i congeneri di diossine e furani (insieme alle classi) e sono state trovate altre molecole persistenti (DDTs, Lindano, PCT) oltre a diversi metalli, fra cui in concentrazioni elevate As, Hg e Pb.

Il campionamento dei terreni è stato effettuato da personale ERSAF nel marzo 2014 ed i risultati delle analisi, effettuate nei laboratori dell'Istituto di ricerche farmacologiche Mario Negri di Milano, sono pervenuti nel giugno successivo.

I risultati di Fase 1 sono stati da ERSAF comunicati ufficialmente agli enti competenti per territorio (Comune, Provincia, ARPA e ASL) oltreché a Regione Lombardia, MATTM, ISPRA e ISS con nota ERSAF prot. 0012389 del 06/08/2014.

2.6.1.2 FASE 2) Verifica dell'andamento della contaminazione dei terreni lungo la profondità

Nell'assunto che l'andamento della contaminazione con la profondità sia legato all'utilizzo del suolo e alle modalità di irrigazione dei terreni fin da quando ha avuto inizio il processo contaminante, si è ricostruita per ognuna delle tre aree prescelte la storia delle pratiche agricole e delle coltivazioni attuate negli anni, la direzione della pendenza dei terreni, i percorsi di rogge e canalette di irrigazione e le modalità di adacquamento dei campi (vedi allegato 2). Sulla base di queste informazioni sono stati prelevati, entro ognuna delle tre aree prescelte, 3 campioni allineati su una retta che rappresentasse la direzione di flusso delle acque di irrigazione e posti a distanza crescente rispetto al punto di origine di immissione dell'acqua sul campo dalla roggia.

In ciascuno di questi 9 punti sono state effettuate perforazioni mediante carotatore a percussione con prelievi di terreno alle seguenti profondità: a) 0-10 cm; b) 10-20 cm; c) 20-30 cm; d) 30-40 cm; e) 40-60 cm; f) 60-80 cm; g) 80-100 cm (7 campioni per ogni perforazione). Tutti i 63 campioni prelevati sono stati analizzati separatamente valutando le concentrazioni delle sostanze selezionate a seguito dei risultati della Fase 1.

Il campionamento di Fase 2 è avvenuto il 27 ottobre 2014 ed i risultati delle analisi sono pervenuti in forma preliminare a inizio dicembre; a seguito di accurata verifica, l'emissione ufficiale dei rapporti di prova è avvenuta il 6 febbraio 2015.

Da un'analisi dei dati ottenuti in Fase 2 si può evidenziare come l'intento che ha originato questa fase, ovvero il ricercare un possibile trend della contaminazione legato alla profondità di campionamento, abbia effettivamente portato a conseguire risultati rilevanti da questo punto di vista: in particolare è emerso generalmente che lo strato relativo alle profondità comprese tra 0 e 40 cm dal p.c., corrispondente grosso modo allo strato arativo, dove è avvenuto un rimescolamento degli spessori interessati, è risultato essere quello interessato dai maggiori livelli di contaminazione (vedi esempio in figura 3). Tale considerazione vale maggiormente per i contaminanti organici mentre la situazione è risultata più eterogenea ad esempio per i metalli, ritrovati anche a maggiore profondità.

In ogni caso i valori riscontrati, in particolare nel primo strato 0-40 cm dal p.c., sono risultati notevolmente elevati, con concentrazioni quasi sempre superiori ai limiti di col. A e in taluni casi superiori anche ai limiti di col. B della tabella 1 allegato 5 al titolo V parte IV del d.lgs. 152/2006. Lievi superamenti dei limiti della suddetta col. A nel campione più profondo (80-100 cm dal p.c.) sono stati rilevati solo per arsenico (in 3 punti) e PCB (in 2 punti).

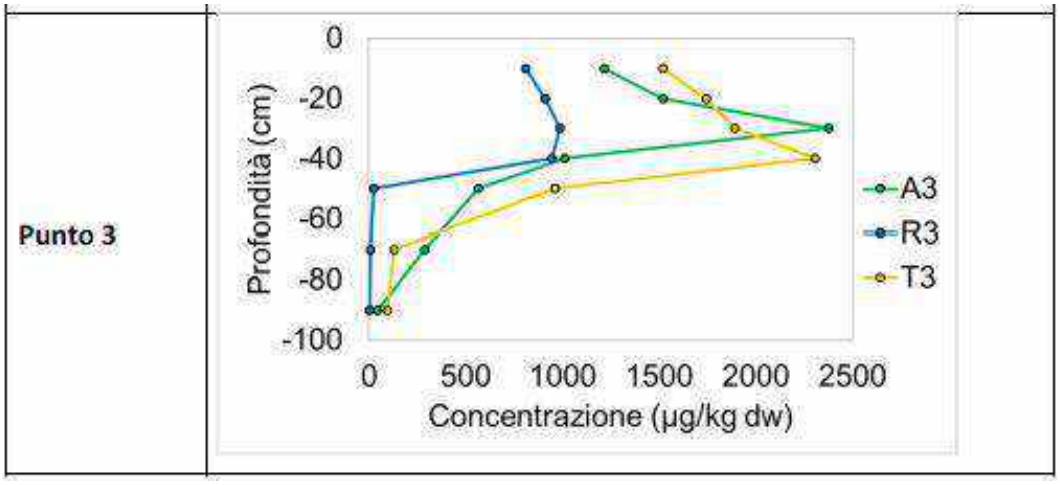


Figura 3: Andamento della concentrazione della somma dei PCB con la profondità in 3 punti nelle aree A, R e T.

Il superamento dei limiti di legge (colonna A) è stato riscontrato anche per alcuni altri metalli (in particolare piombo ma anche zinco e rame) e per i pesticidi clorurati (sommatoria DDD, DDT, DDE) in un considerevole numero di campioni mentre l'analisi dei dati di tetracloruro di carbonio ha mostrato una distribuzione spaziale con alcuni hotspot nelle aree in esame.

I risultati di Fase 2 sono stati comunicati ufficialmente agli enti competenti per territorio (Comune, Provincia, ARPA e ASL) oltreché a Regione Lombardia, MATTM, ISPRA e ISS con nota ERSAF prot. 0003362 del 27/02/2015.

2.6.1.3 FASE 3) Ricostruzione tridimensionale della contaminazione

Questa fase è consistita in una campionatura sistematica nelle tre zone di sperimentazione e nella esecuzione delle relative analisi, finalizzata alla costruzione di un modello numerico della contaminazione consistente in una unione di celle tridimensionali che inglobano il volume di suolo contaminato.

Il campionamento, sorretto dai risultati di Fase 2, è stato effettuato secondo una maglia regolare di lato 50 x 50 m che ha inglobato i punti dei campionamenti precedenti (Fase1 + Fase2). Ciascun campione, ubicato in un punto della maglia, è stato composto da 5 prelievi, effettuati nel top soil (spessore interessato 0-40 cm), ubicati ai vertici di un quadrato di lato 1 m e nel suo punto centrale, quest'ultimo coincidente con il punto della maglia. I campioni compositi realizzati sono stati 64 mentre i punti di prelievo sono stati 320 (figura 4). Il campionamento è stato effettuato a fine dicembre 2014; i risultati preliminari delle analisi effettuate sono pervenuti a fine gennaio 2015 mentre l'emissione ufficiale dei rapporti di prova, successiva alla validazione dei dati da parte di ERSAF, è avvenuta il 5 marzo 2015.



Figura 4: Punti di campionamento di Fase 3

Da un'analisi dei risultati di questa fase della caratterizzazione si evince come sia stata confermata la significativa presenza dei metalli arsenico e mercurio, i cui valori sono quasi sempre superiori ai limiti di legge previsti dal d.lgs. 152/2006 per siti ad uso Verde pubblico privato e residenziale (colonna A) ed in molti casi, soprattutto l'arsenico, anche di quelli per siti ad uso commerciale e industriale (colonna B). I limiti di colonna A sono frequentemente superati anche dal piombo e dallo zinco e, con minor frequenza, dal rame.

Tra i contaminanti organici è stato confermato l'elevato peso dei PCB (valori totali, espressi come somma delle concentrazioni, sempre superiori ai limiti di colonna A ed in qualche caso anche di colonna B), con maggior presenza delle classi alto clorurate (da penta a deca clorobifenili). Comportamento analogo si è riscontrato per le diossine e i furani (espressi come sommatoria con conversione T.E.).

Il superamento dei limiti di legge (colonna A) è stato riscontrato anche per i valori dei pesticidi clorurati (sommatoria DDD, DDT, DDE) in un considerevole numero di campioni mentre l'analisi dei dati di tetracloruro di carbonio non ha mostrato superamenti rispetto al limite proposto con parere dall'ISS per i terreni.

I risultati di Fase 3 sono stati comunicati ufficialmente agli enti competenti per territorio (Comune, Provincia, ARPA e ASL) oltreché a Regione Lombardia, MATTM, ISPRA e ISS con nota ERSAF prot. 0007492 del 13/05/2015.

2.6.1.4 Caratterizzazione microbiologica

Nel corso dei campionamenti della caratterizzazione è stata sempre prelevata (nei campioni puntuali) o costituita (in quelli compositi) un'aliquota da destinare all'analisi microbiologica, effettuata su una selezione di campioni nel laboratorio del Dipartimento Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione, l'Ambiente dell'Università di Milano.

I campioni selezionati sono stati analizzati inizialmente per valutarne la generale diversità batterica, allo scopo di evidenziare se le caratteristiche chimico-fisiche e di contaminazione dei suoli fossero correlate con la diversità del microbiota ivi contenuto.

I dati ottenuti hanno indicato che le comunità batteriche del suolo:

- sono significativamente differenziate in funzione della profondità di prelievo (fase 2 del monitoraggio);
- sono diverse nelle tre aree di prelievo (fase 3 del monitoraggio, focalizzata nell'analisi dei primi 40 centimetri di suolo, dove risiede la porzione più significativa di inquinanti).

Questo risultato sembra indicare che il profilo di concentrazione delle molecole inquinanti influenza con buona probabilità la composizione delle comunità batteriche del suolo, possibilmente favorendo l'arricchimento di popolazioni degradatrici, ipotesi sostenuta dalla presenza in tutte e tre le aree del gene *bphA* (marcatore molecolare che denota la presenza di popolazioni batteriche aventi metabolismo potenzialmente degradativo nei confronti dei PCB).

È stata inoltre effettuata l'identificazione tassonomica di 171 batteri isolati nel laboratorio della prof.ssa Borin dalle radici di tre piante spontanee (Centaurea nigrescens, Medicago sativa e Dactylis glomerata) campionate nel 2014 nel SIN Brescia-Caffaro, che comprende *119 ceppi batterici* in grado di utilizzare bifenile (struttura priva di clori della molecola dei PCB) come fonte di carbonio.

L'analisi ha permesso di individuare, nella collezione di isolati, alcuni gruppi tassonomici noti in letteratura per il loro potenziale ruolo di risanamento verso inquinanti organici clorurati; deve però essere dimostrata (sperimentazione in atto) la reale capacità dei ceppi di utilizzare i PCB.

Una selezione di ceppi è stata inoltre saggiata per la capacità di promuovere la crescita delle piante potenzialmente impiegabili per il fitorimedio dell'area, individuando in particolare 2 isolati con promettente attività.

Per maggiori dettagli riguardanti le attività in campo microbiologico si rimanda alla apposita sezione (par. 2.3) presente nelle Linee guida a cura dei consulenti scientifici.

2.6.2 Sperimentazione in serra

2.6.2.1 Inquadramento

La sperimentazione in serra si è svolta nel biennio 2015-2016.

Tra la fine del 2014 e l'inizio del 2015, insieme ai consulenti scientifici, è stata avviata la riflessione sulle piante da sottoporre a sperimentazione attraverso un'attenta ricerca bibliografica su altre sperimentazioni effettuate in ambito nazionale e internazionale, considerando maggiormente, tra le specie per le quali siano stati riportati risultati incoraggianti, quelle che abbiano mostrato maggiori interazioni con le comunità batteriche (sperimentazione in serra di UNIMI per la scuola estiva FACILIS) e che siano presenti nel SIN, a garanzia della compatibilità ambientale della sperimentazione e della reale possibilità di crescita in campo delle piante. Sulla base di queste premesse è stato stilato un elenco di specie vegetali candidate alla sperimentazione, è stato predisposto il protocollo della sperimentazione e l'elenco delle analisi chimiche e microbiologiche necessarie (vedi le Linee guida scientifiche, cap. 4).

Dal punto di vista logistico inizialmente si era deciso di collocare la serra per la sperimentazione su un terreno di pertinenza dell'azienda agricola Antonioli, in una delle aree (area A) oggetto di caratterizzazione integrativa; su quest'area è stata dunque effettivamente posizionata una nuova serra e un container a servizio del cantiere sperimentale. Immediatamente dopo la posa, nel mese di marzo 2015 (ancora prima che fossero collocati i vasi sperimentali), i teli di copertura della serra sono stati oggetto di atti vandalici ad opera di ignoti, prontamente denunciati presso la stazione dei C.C. di Brescia. Questo evento ha fatto ritenere non sicura tale sistemazione e ha determinato la necessità di ubicare la serra in un luogo più protetto per salvaguardare la scientificità e validità della sperimentazione; dopo una valutazione delle opzioni possibili è stata allo scopo individuata una serra in disuso dell'ITAS "Giuseppe Pastori" di Brescia, ubicata in luogo recintato e protetto, le cui caratteristiche erano compatibili con le esigenze di ERSAF. È stato sottoscritto un accordo di collaborazione con l'Istituto (formalizzato con PEC del 16.04.2015), che ha concesso in disponibilità ad ERSAF la serra sopra citata, che è stata oggetto di lavori di sistemazione e adeguamento degli impianti a cura di ERSAF.

2.6.2.2 Scelta delle piante e trattamenti da testare

Un ampio ed approfondito studio della letteratura scientifica internazionale ha permesso di selezionare un consistente numero di specie vegetali per le quali precedenti casi studio hanno ottenuto risultati positivi impiegando tecniche di biorimedio in situazioni comparabili di contaminazione e nei quali fossero state impiegate specie vegetali compatibili con le condizioni ambientali del SIN Brescia-Caffaro. Il lavoro, unitamente all'elaborazione geostatistica dei risultati della fase di caratterizzazione degli inquinanti, ha reso inoltre possibile la definizione di un accurato protocollo per la sperimentazione in serra (*"Protocollo per gli esperimenti di rhizoremediation"*) che ha descritto in dettaglio le diverse fasi operative, le modalità di coltivazione delle piante e di somministrazione dei trattamenti previsti e i tempi di campionamento, con l'obiettivo di testare le risposte delle piante in termini di accrescimento di biomassa, interazioni con la componente microbica del suolo e successo nella rimozione (sia per fitoestrazione che per degradazione) dei contaminanti definiti nell'Accordo di Programma.

Si ricorda in sintesi che la sperimentazione in vaso ha confrontato 10 diverse tesi sperimentali, costituite dall'associazione fra 7 diverse specie vegetali con diversi trattamenti, in aggiunta a 7 controlli. Ogni tesi ha previsto 3 repliche "*sacrificali"* per ciascun tempo (o fase) sperimentale. I tempi considerati nel biennio sono stati 5 ed in corrispondenza di ciascuno sono stati prelevati campioni del suolo contenuto nei vasi e della biomassa vegetale (sia ipogea – radici, che epigea – fusti e foglie) da sottoporre ad analisi chimica e microbiologica.

PIANTE

- *Phalaris arundinacea*
- *Festuca arundinacea*
- *Cucurbita pepo spp pepo*
- *Medicago sativa*
- *Brassica juncea*
- *Salix caprea*
- *Athyrium filix-femina*

TRATTAMENTI

- *Cicli di sommersione*
- *Aggiunta di ammendanti inorganici (fertilizzante, tiosolfato)*
- *Aggiunta di ammendanti organici (compost)*
- *Consociazione di piante diverse*
- *Utilizzo di piante micorrizate*

L'elenco di tutte le tesi e i controlli testati è invece riportato nella seguente tabella.

Tabella 3: elenco delle tesi sperimentali e dei controlli della sperimentazione in vaso

N° tesi	Descrizione tesi
P1	Phalaris arundinacea solo pianta
P2	Phalaris arundinacea ciclo redox
P3	Festuca arundinacea solo pianta
P4	Festuca arundinacea consociazione con Cucurbita pepo spp pepo
P5	Festuca arundinacea ciclo redox
P6	Festuca arundinacea aggiunta compost
P7	Medicago sativa micorrize e rizobio
P8	Salix caprea consociazione con Athyrium filix-femina
P9	Brassica juncea
P10	Brassica juncea tiosolfato

N° controllo	Descrizione controlli
C1	suolo contaminato senza pianta e non fertilizzato
C2	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato
C3	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con ciclo redox
C4	suolo contaminato senza pianta me fertilizzato e con aggiunta tiosolfato
C5	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con aggiunta compost
C6	suolo non contaminato con pianta e fertilizzato (*Medicago sativa + Festuca arundinacea)*
C7	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con panetto/i di terra

2.6.2.3 Preparazione del terreno da utilizzare nei vasi

Una grande attenzione è stata dedicata alla scelta, prelievo e preparazione del terreno da utilizzare per riempire i vasi, oggetto di uno specifico protocollo predisposto dai consulenti scientifici. In conformità al protocollo è stata effettuata in campo una prolungata omogenazione del terreno prelevato, mediante ripetute fasi di "quartatura" e "stratificazione" del campione.

Ciò ha permesso di ottenere un terreno con elevato grado di omogeneità, come confermato da analisi effettuate allo scopo (indicatori considerati: granulometria del suolo, percentuale di carbonio organico e dei contaminanti As, Hg e PCB) e ha garantito quindi le stesse condizioni di partenza per tutte le tesi oggetto della sperimentazione.

2.6.2.4 Conduzione della sperimentazione in serra

Come già detto la sperimentazione in serra si è svolta nel biennio 2015 -2016.

La conduzione della sperimentazione ha richiesto un grande impegno da parte del personale ERSAF, in particolare per le necessarie attività di gestione dell'irrigazione e per garantire i monitoraggi previsti (rilevamenti dell'umidità del terreno nei vasi e del potenziale redox nelle tesi sottoposte a cicli di sommersione), con un coinvolgimento 7 giorni su 7 per le due intere stagioni vegetative.

A seguito del T4, l'ultimo campionamento previsto dal programma di sperimentazione, si è provveduto a dismettere la serra che ha ospitato le prove in vaso, serra che dopo un'accurata pulizia è stata restituita nella disponibilità dell'ITAS Pastori (vedi nota prot. ERSAF.2016.0015143 del 22/12/2016).

2.6.2.5 Campionamenti dei suoli e dei vegetali

I campionamenti effettuati nel corso della sperimentazione sono stati 5:

1. *T0 - 13/20 maggio 2015;*
2. *T1 - 13/29 luglio 2015;*
3. *T2 - 9 novembre/10 dicembre 2015;*
4. *T3 - 4/20 luglio 2016;*
5. *T4 - 24 ottobre/16 novembre 2016.*

Si è proceduto al campionamento del suolo e dei vegetali, distinguendo la parte epigea da quella ipogea. Per il campionamento dei suoli è stata utilizzata una metodologia particolare di campionamento incrementale, cd. "Japanese Slab Cake" (JSC)*, che garantisce elevati livelli di rappresentatività del campione prelevato rispetto al materiale oggetto di campionamento.

2.6.2.6 Analisi chimiche

Per la sperimentazione sono stati prodotti numerosi (diverse centinaia) campioni di terreno e di materiale vegetale da sottoporre ad analisi chimiche. Per questo servizio di analisi chimiche nel 2015 ERSAF ha indetto una gara in SINTEL che è stata aggiudicata ai Laboratori INDAM di Castel Mella (BS) (Decreto n. III/677 del 04/09/2015).

Il pacchetto analitico richiesto al laboratorio ha compreso la ricerca dei seguenti parametri:

* *Incremental Sampling Methodology*. ISM-1. Washington, D.C.: ITRC - Interstate Technology & Regulatory Council, Incremental Sampling Methodology Team (www.itrcweb.org)

Metalli: arsenico, mercurio, piombo, rame, zinco

PCB: 79 congeneri e la somma delle classi di clorurazione

PCDD/F: 7 diossine e 10 furani

DDT, DDD, DDE

Carbonio organico

Ai fini della valutazione della reale capacità fitoestrattiva delle cosiddette piante accumulatrici, strettamente legata alla biodisponibilità del metallo, è stato fatto un approfondimento sui metalli arsenico e mercurio per i quali sono state eseguite apposite analisi di speciazione (vedi allegati 3 e 4).

2.6.2.7 Validazione dei dati analitici

In questo paragrafo si vuole riepilogare la complessa questione che ha riguardato la validazione dei dati analitici, relativi ai campioni della sperimentazione in serra, prodotti dal laboratorio INDAM. Questa vicenda ha avuto un impatto significativo sulle tempistiche del progetto, essendosi protratta per quasi 2 anni, dal 2016 fino al 2018; la risoluzione, positiva, della questione è avvenuta giusto negli ultimi mesi di quest'anno, poco prima della consegna finale dei risultati e della presentazione dei documenti conclusivi. Di seguito il dettaglio della vicenda.

Il laboratorio INDAM ha preso in carico i primi campioni a dicembre 2015, specificatamente quelli prelevati ai tempi T0 e T2 relativi al 1° anno di sperimentazione; una prima tranche degli esiti analitici, per la parte relativa ai terreni, è stata inviata dal laboratorio nel mese di marzo 2016, per un numero di campioni pari a 74, mentre la parte relativa alle analisi sui vegetali è pervenuta a luglio 2016.

Fin dal primo invio di marzo il gruppo dei consulenti scientifici ha sollevato alcuni dubbi sull'attendibilità dei dati prodotti dal laboratorio, dubbi esposti per la prima volta durante un incontro del Gruppo di Lavoro del 20 aprile 2016.

I consulenti scientifici hanno espresso riserve sull'attendibilità dei dati analitici contestando in particolare la bassissima e a loro dire anomala (confrontata con analoghe misurazioni riportate nella letteratura scientifica internazionale) variabilità fra le diverse repliche dei campioni di una stessa tesi/prova per i parametri PCB e PCDF (furani).

A seguito di un incontro avvenuto a Milano il 30.11.2016, presenti ERSAF, i consulenti scientifici, il Commissario Straordinario per il SIN (dott. Roberto Moreni) e Regione Lombardia

(ing. Angelo Elefanti), ERSAF ha notificato a INDAM (lettera a prot. ERSAF.2016.0014167 del 02.12.2016) i dubbi sui dati presentati, richiedendo contestualmente una cospicua documentazione (il cui elenco è stato definito dai consulenti ERSAF e dai funzionari del servizio di Metrologia ambientale di ISPRA durante un incontro svoltosi in data 15.11.2016) a comprova della qualità del lavoro svolto, alla quale INDAM ha dato riscontro in data 21.12.2016 inviando un primo campione parziale di dati.

A fine 2016 questa criticità non era ancora stata risolta; tale situazione non ha condizionato il regolare prosieguo della sperimentazione in vaso che come detto sopra ha visto svolgersi come da programma i campionamenti ai tempi T3 e T4 e dunque è stata portata avanti fino al programmato esaurimento di tutti i vasi preparati per la sperimentazione.

Questa situazione si è protratta anche nel 2017, dove il lavoro svolto ha portato a concordare e definire, insieme a RL e ai consulenti scientifici, la strada da percorrere per uscire dall'impasse sopra descritta. ERSAF ha comunicato formalmente i dubbi pervenuti dalle Università a Regione Lombardia e p.c. al Ministero dell'Ambiente e al Commissario con propria nota prot. 3348 del 03.02.2017. A seguito di questa comunicazione si è deciso di chiedere supporto al Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA per la validazione dei dati analitici oggetto di discussione. Il primo passo è stato quello di sottoporre i dati a ISPRA per una sua valutazione, che è stata espressa ufficialmente con nota tecnica prot. 3424/cn-lab dell'11 maggio 2017. In tale nota ISPRA, pur confermando la presenza di anomalie, ha consigliato di proseguire con le analisi da parte del Laboratorio (con una serie di condizioni) per verificare se queste successive analisi avrebbero confermato i risultati fino ad allora ottenuti.

A seguito di questa nota ERSAF ha dunque formalizzato a ISPRA una richiesta di collaborazione con propria nota prot. 10910 del 7 luglio 2017; il processo di coinvolgimento è stato particolarmente lungo e difficoltoso e si è concretizzato solo a fine anno quando l'ISPRA ha accettato ufficialmente la richiesta di collaborazione con propria nota prot. 55090 del 7 novembre 2017. Come richiesto nella nota di ISPRA, ERSAF ha accettato a sua volta i termini della collaborazione con propria nota prot. 15145 del 13 novembre 2017.

Nel mese di dicembre 2017 è iniziata dunque l'interlocuzione ufficiale con ISPRA per definire e pianificare le attività necessarie alla fase di validazione dei dati attraverso l'analisi dei dati del T4 sotto la supervisione di ISPRA stessa. In data 18 gennaio 2018 si è tenuto un incontro presso i laboratori INDAM fra personale INDAM, ISPRA ed ERSAF per concordare appunto le modalità operative di esecuzione delle analisi del T4; in questa sede si è deciso di

ripetere anche le analisi sul T0, in modo da avere, al termine di questa fase di verifica, dei dati validati relativi sia all'inizio sia al termine della sperimentazione in vaso.

INDAM ha restituito gli esiti analitici dei campioni di suolo del T4 e della ripetizione del T0 a marzo 2018 e gli esiti dei campioni di vegetali del T4 a giugno 2018 (in numerosi invii parziali); all'inizio di agosto ISPRA ha inviato una nota dove, a seguito della valutazione dei dati prodotti da INDAM, ha espresso un giudizio positivo sulla correttezza/attendibilità di queste nuove tornate di dati, consentendo dunque un loro utilizzo per le elaborazioni sui risultati ottenuti nel corso della sperimentazione. Allo stesso tempo ISPRA ha evidenziato delle differenze fra il gruppo di campioni relativi alla ripetizione del T0 a confronto con quelli del T0 originale, elemento che ha motivato la richiesta a Indam di ripetere anche le analisi sul T2. Indam ha dunque analizzato nuovamente anche i campioni del T2, restituendone gli esiti fra ottobre e l'inizio di novembre 2018.

Il giorno 12 novembre si è tenuto un incontro tra ISPRA, ERSAF e i Consulenti scientifici, mentre il 13 novembre 2018 si è tenuta una riunione presso i laboratori INDAM a cui hanno partecipato INDAM stessa, ISPRA e ERSAF: in questi incontri sostanzialmente ISPRA ha confermato la bontà e dunque la validità di tutte le ultime tornate di analisi (T4, ripetizione del T0 e del T2) condotte da INDAM sotto la supervisione di ISPRA, e pertanto questi dati potranno essere utilizzati da ERSAF e dai consulenti scientifici per le elaborazioni relative alla sperimentazione. ISPRA ha sottolineato la capacità analitica del laboratorio INDAM e ha ipotizzato come il basso coefficiente di variabilità, ritenuto anomalo dai consulenti scientifici, possa essere dipeso dal protocollo di preparazione dei campioni molto rigoroso ed innovativo.

La nota di ISPRA con allegata la relazione tecnica sulla validazione dei risultati prodotti dal laboratorio INDAM, a firma del responsabile dell'Area Metrologia - Centro Nazionale della Rete Nazionale dei laboratori, è pervenuta in data 24/12/2018 (allegato 5).

2.6.2.8 Risultati della sperimentazione in serra

I risultati della sperimentazione in serra sono illustrati ampiamente nelle Linee guida scientifiche alle quali si rimanda per qualsiasi approfondimento.

Nelle stesse Linee guida sono anche indicate le azioni messe in atto per dare risposta (nei limiti di quanto indicato nel precedente par. 2.2.3) alle prescrizioni impartite dal MATTM in sede di CdS del 16/12/2014.

2.6.2.9 Prove in campo

DESCRIZIONE

A conclusione del progetto si può dire che la parte relativa alla sperimentazione in campo ha avuto alcuni limiti, dovuti principalmente ai ritardi nella validazione dei dati della sperimentazione in vaso per quanto riguarda la scelta delle tesi che sono state testate, che non si sono rivelate essere del tutto coincidenti con quelle che, al termine dei 2 anni di sperimentazione, con i risultati validati, sono risultate essere le più efficaci in termini di degradazione e assorbimento dei contaminanti. Inoltre si sono avuti anche alcuni problemi di tipo agronomico, in particolare per una tesi (Phalaris arundinacea), come verrà descritto in dettaglio di seguito.

Il fatto di non aver potuto disporre di risultati validati relativi al primo anno di sperimentazione in vaso (T0 e T2) ha parzialmente influito sul programma di trasposizione in campo della sperimentazione: nel 2016 era previsto infatti di provare in campo le tesi che dalla sperimentazione in serra avrebbero mostrato i risultati più incoraggianti sulla capacità di diminuire le concentrazioni dei contaminanti nel suolo. Non avendo a disposizione dati validati si è deciso di procedere comunque all'allestimento di un campo sperimentale testando le tre tesi che, dai dati preliminari, pur se in fase di validazione, avevano avuto i migliori risultati in termini di diminuzione delle concentrazioni di contaminanti per le due diverse tipologie, organici persistenti e metalli pesanti; in particolare sono state provate la Festuca arundinacea, la Phalaris arundinacea e la Brassica juncea.

Il campo con i plot sperimentali è stato allestito in un terreno di proprietà dell'Azienda Agricola Antonioli: sono state preparate 24 parcelle sperimentali, 6 per ognuna delle 4 tesi (Festuca, Phalaris, Brassica e controllo), della dimensione di 10 x 10 m di lato, secondo lo schema di figura 5.

La Brassica nel complesso ha compiuto n. 4 cicli di coltivazione:

i. *21 aprile - 28 giugno 2016*

   sviluppo completo

ii. *1 settembre 2016 - aprile 2017*

   attacco di larve di Athalia rosae in data 19/20 settembre 2016, sviluppo compromesso quasi completamente

iii. *9 giugno - 8 agosto 2017*

   sviluppo completo

iv. *20 ottobre 2017 - 24 maggio 2018*

   sviluppo completo

Nel 2016 la Brassica ha regolarmente completato il suo primo ciclo ed è stata riseminata per farle compiere un secondo ciclo in data 01/09/2016. Questo secondo ciclo è stato però compromesso da un pesante attacco da parte di larve di Athalia rosae, un imenottero segnalato come avversità per le Brassicacee, avvenuto intorno alla seconda metà di settembre, che ha completamente mangiato le foglie delle giovani piantine da poco seminate. Per contrastare l'attacco si sono effettuati un paio di trattamenti con prodotti appositi ma i danni sono stati tali da non consentire alle piante di riprendersi a sufficienza per superare l'inverno. Per quanto riguarda la Brassica dunque nel 2016 si è portato a termine un ciclo vegetativo completo e uno solo iniziato e interrotto per cause avverse.

Nel 2017 si è proceduto a una nuova semina delle stesse parcelle che è avvenuta il 9 giugno 2017: anche in quest'anno la coltivazione è stata oggetto di un attacco parassitario ad opera della stessa larva di *Athalia rosae* (Tentredine delle crucifere) che però a differenza degli attacchi precedenti non ha arrecato grandi danni, essendo intervenuti tempestivamente, e dunque lo sviluppo della pianta si è potuto completare e un campionamento al termine del ciclo vegetativo è stato eseguito in data 8 agosto 2017. Successivamente le piante sono state tagliate, trinciate e interrate con un'aratura. In data 20 ottobre 2017 è stata seminata per la quarta volta la Brassica nelle parcelle dedicate al fine di far compiere loro un ciclo vegetativo a cavallo dell'inverno; nella primavera successiva la pianta ha correttamente completato il suo ciclo ed è stata raccolta e campionata il 24/05/2018.

Per quanto riguarda la Festuca, trattandosi di una graminacea perenne, questa è stata seminata con l'intento di creare un prato permanente per tutta la durata della prova. Il primo tentativo però, con la semina effettuata ad aprile 2016, non ha avuto esito positivo, probabilmente a causa dell'epoca di semina leggermente tardiva (la tempistica è stata vincolata da valutazioni sulla applicabilità in campo delle tesi sperimentali alla luce delle prescrizioni fatte in sede di CdS ministeriale del 16/12/2014). Per questo motivo si è proceduto a un secondo intervento autunnale di preparazione del terreno delle parcelle e successiva semina in data 12/10/2016, che ha visto il corretto insediamento e sviluppo della coltivazione (per maggiori informazioni sulla gestione di questa coltura sono stati presi contatti con il Centro di ricerca per le produzioni foraggere e lattiero-casearie di Lodi).

Per la prima parte del 2017 le parcelle sono state gestite senza fare alcun intervento, quali sfalci della vegetazione, lasciando così crescere la *Festuca* insieme alle altre piante, specialmente annuali, per loro natura più veloci e competitive nello sviluppo (es. papaveri). Questo tipo di gestione ha fatto sì che la festuca sia rimasta sempre in un ambiente ombreggiato e più umido ma ne ha limitato lo sviluppo. Allo scopo di affinare le conoscenze

sul comportamento della *Festuca* e la gestione agronomica di questa coltivazione nelle condizioni sito specifiche nel corso del 2017 sono state approntate ulteriori parcelle di *Festuca* in un'altra area del SIN in nostra disponibilità: nello specifico si sono condotte delle prove con diversi tipi di gestione agronomica, partendo dal tipo di semina (tradizionale, con minima lavorazione e su sodo) e proseguendo con interventi differenziati di sfalcio o non sfalcio delle parcelle. Queste prove proseguite anche nel 2018, hanno avuto lo scopo di acquisire informazioni sulle migliori tecniche agronomiche di gestione di questa coltivazione da applicare nel caso fosse stata individuata fra quelle da utilizzare per il progetto di bonifica tramite biorimedio. A seguito di queste prove a ottobre 2017 si è dunque deciso di effettuare uno sfalcio di tutte le parcelle di *Festuca*, e parallelamente delle parcelle controllo, al fine di liberare la *Festuca* dalla biomassa sovrastante e favorirne lo sviluppo.

Nel 2018 è proseguita senza intoppi la coltivazione della Festuca, sono stati effettuati 2 sfalci, a maggio e a luglio, e il materiale di risulta come di prassi è stato lasciato sul terreno.

La *Phalaris* è stata la specie per la quale si sono avute le maggiori difficoltà di coltivazione, e sostanzialmente si può dire che i tentativi di coltivare questa pianta sono stati complessivamente vani.

Nel 2016 era stata seminata una prima volta ad aprile, insieme alle altre parcelle, ma senza risultato; era seguita una semina autunnale che inizialmente era sembrata aver avuto successo ma con la primavera 2017 si è assistito alla totale mancata crescita delle piante. Questo nuovo fallimento ci ha spinto a intraprendere anche altre strade per provare a capire come far crescere e gestire questa coltura. Per questo ci siamo rivolti a un vivaio della zona, Vivai Valfredda, per valutare insieme a loro diverse soluzioni possibili; si è pensato di prelevare lungo una roggia facente parte del reticolo individuato come SIN alcune piante di *Phalaris arundinacea* naturalmente presenti, queste sono state poi portate presso il vivaio che si è occupato di moltiplicarle mediante riproduzione agamica. L'idea, con questo metodo, è di ottenere un numero di piante sufficienti a creare un campo madre che verrebbe poi utilizzato per prelevare il materiale vegetale necessario a essere trapiantato nelle aree di interesse oggetto di interventi di biorimedio.

A ottobre 2017 si è comunque deciso di fare un altro tentativo di semina di *Phalaris* nelle parcelle dedicate: anche questo tentativo si è rivelato infruttuoso. In conclusione si può dire che le parcelle di Phalaris non possono essere considerate nella prova in campo dato che non si è riusciti a far crescere e sviluppare questa pianta; questo insuccesso è in parte giustificabile considerato che si tratta di una pianta che non ha alcun utilizzo agrario ma piuttosto viene usata in contesti quali giardini ornamentali per cui la mancanza di esperienza

ha giocato un ruolo determinante. Questi 2/3 anni di sperimentazione sono serviti in ogni caso a farsi quell'esperienza che appunto mancava: il confronto con i Vivai Valfredda sopra citati è stato molto proficuo e ha permesso di individuare la strada che probabilmente garantirebbe buoni risultati in termini di coltivazione di questa specie ovvero la propagazione agamica di giovani piantine.

Per la sperimentazione in campo ci si è avvalsi, oltre che del personale ERSAF, di una consulenza con il Consorzio Condifesa Lombardia Nord Est, specificatamente per alcuni aspetti agronomici quali la difesa fitosanitaria delle colture e la tematica dell'agricoltura conservativa: il servizio di collaborazione in particolare è stato prestato dal dott. Mauro Agosti, del Servizio Tecnico di Condifesa.

RISULTATI

I risultati analitici della sperimentazione in campo sono pervenuti da INDAM in data 18/12/2018 e sono stati dunque successivamente valutati dai consulenti scientifici, che in data 22/01/2019 hanno inviato un documento, denominato "Addendum a Linee guida scientifiche per la bonifica biologica delle zone agricole del SIN Brescia-Caffaro" (allegato alle Linee guida scientifiche), contenente le loro prime elaborazioni su questi dati.

Sostanzialmente le valutazioni dei CS evidenziano come, valutando le singole parcelle, si siano riscontrate generalmente delle diminuzioni delle concentrazioni dei contaminanti fra il tempo iniziale (febbraio/marzo 2016) e quello finale (luglio 2018) per PCB e PCDD/F mentre per i metalli le diminuzioni si sono viste solo in poche parcelle; a tali diminuzioni in ogni caso non è possibile attribuire una significatività statistica in quanto appunto si tratta di un confronto sulle singole parcelle, senza repliche. Un altro tipo di valutazione è stata fatta mettendo a confronto la media delle 6 parcelle di una tesi sperimentale con la media delle 6 parcelle controllo: in questo caso si è potuto applicare il test statistico "t-student" che però non evidenzia riduzioni di concentrazione statisticamente significative a causa dell'elevata variabilità delle concentrazioni fra le diverse repliche, che maschera le possibili diminuzioni. Tuttavia i dati sopra discussi potranno essere utili per programmare successive sperimentazioni con le specie selezionate per verificare l'effettiva riduzione in campo degli inquinanti.

2.7 Attività previste dall'AdP: Fase 1 - Azione C: Progettazione e realizzazione di aree boscate

Sono stati realizzati gli interventi di forestazione in attuazione dell'azione C, conformi al progetto definitivo presentato al MATTM nel novembre 2014; nello specifico è stato possibile effettuare interventi per una superficie compatibile a quella indicata nell'Accordo di

Programma (circa 6,8 ettari) mediante la creazione di fasce e macchie boscate, siepi arboree e/o arbustive e filari di alberi, e la realizzazione di interventi di miglioramento al soprassuolo forestale di boschi esistenti.

Particolarmente difficile si è rivelata la fase di ricerca e verifica di disponibilità a consentire la realizzazione di aree boscate da parte dei proprietari sui loro terreni, soprattutto in mancanza di incentivi che potessero controbilanciare il sacrificio economico per i vincoli che tale scelta comporta.

Deve essere considerato anche quanto già indicato nel precedente par. 2.2.2, ovvero che l'allegato dell'Accordo di Programma individuava quali aree da sottoporre ad azione di rimboschimento quelle limitrofe al fiume Mella, che risultavano in buona parte già rimboschite nel 1998 dall'allora Azienda Regionale delle Foreste (ora ERSAF) e per la rimanente parte erano prevalentemente aree edificate.

I numerosi contatti con i proprietari delle aree agricole e con le aziende attive, avviati con la collaborazione fattiva delle organizzazioni agricole (Confagricoltura, Coldiretti, CoopAgri, CIA), non hanno dato esito favorevole in quanto nessun proprietario privato ha accettato l'idea che una porzione della proprietà diventasse definitivamente bosco.

A seguito di ciò ERSAF ha proposto modalità attuative diverse dalla piantumazione ex-novo di formazioni considerabili come bosco ai sensi di legge, come ad esempio la realizzazione di fasce boscate di larghezza inferiore al limite (pari a 25 m) previsto dalla definizione giuridica di bosco, che fossero al contempo compatibili con le finalità indicate nell'Accordo di Programma e con la superficie totale piantumata e ritenute maggiormente adeguate alla realtà e alle problematiche locali dato che consentirebbero in caso di cambi di destinazione del suolo in senso edificatorio la cessazione degli obblighi contrattuali ventennali di divieto di trasformazione.

Tale proposta di cambiamento, formalmente comunicata alla D.G. Ambiente Energia e Sviluppo Sostenibile con la nota ERSAF n. 2014.0008963 del 29/05/2014, ha privilegiato la creazione di strutture vegetali capaci di esplicare un "effetto barriera" nei confronti dei contaminanti dispersi in atmosfera, pur non costituendo boschi ai sensi di legge (LR 31/2008).

È stata quindi proposta ai proprietari dei terreni ricadenti nelle aree agricole del SIN la realizzazione di un sistema di fasce boscate (di larghezza inferiore a 25 m), macchie boscate (inferiori ai 2.000 mq), siepi arboree e/o arbustive e filari di alberi nella convinzione che questa soluzione fosse altrettanto efficace nell'intercettare attraverso la chioma delle piante le

particelle di contaminanti trasportate dal vento e nell'ostacolarne la diffusione oltre i confini delle aree agricole del SIN.

Con questo compromesso è stato possibile sottoscrivere accordi con tre proprietà private. Un incentivo alla sottoscrizione dell'accordo era dato dal fatto che per due delle tre aziende agricole conduttrici delle aree private interessate, era stata proposta la possibilità di realizzare direttamente le opere di forestazione mediante affidamento di lavori ai sensi dell'art. 15 del Decreto Legislativo 18 maggio 2001, n. 228. Al momento di avviare i lavori una delle due aziende ha però rinunciato per cui in quel caso i lavori sono stati realizzati in amministrazione diretta da parte di ERSAF.

Gli accordi con i proprietari privati dei terreni oggetto di piantumazione di nuove fasce boscate hanno previsto l'impegno, a garanzia dell'investimento e dell'efficacia dell'intervento, a non eliminare le strutture arboree realizzate, a meno di eventuali trasformazioni urbanistiche da loro attese, per un tempo sufficiente a garantire lo svolgimento della funzione/servizio eco sistemico (almeno vent'anni).

Sulle aree pubbliche disponibili sono state realizzate fasce boscate che in un caso (proprietà del Comune di Brescia tra via Sorbana e la tangenziale ovest) costituisce una vera e propria superficie forestale (bosco ai sensi di legge) (figura 5) ed in un altro rappresenta un'estensione della superficie di bosco esistente. Nell'area demaniale immediatamente a nord della Ferrovia Milano – Venezia, lungo l'argine del fiume Mella, la fascia boscata è stata realizzata con il consenso dell'organo di polizia idraulica (AIPO).



Figura 5: nuovo bosco realizzato su un mappale di proprietà del Comune di Brescia

Sono stati effettuati numerosi tentativi di coinvolgimento di ulteriori proprietari terrieri, in particolare nella zona orientale di via Rose di Sotto, dove vi sono aree in evoluzione naturale verso formazioni boschive, senza ottenere risultati apprezzabili. A ottobre 2018 ERSAF ha formalizzato la richiesta di inserire entro il perimetro del bosco del Piano di Indirizzo Forestale della Provincia di Brescia una di queste aree, per una superficie pari a 1,49 ha (vedi nota prot.ERSAF.2018.0010419 del 17/10/2018), in quanto la copertura arboreo-arbustiva ormai presente sull'area fa sì che a tutti gli effetti di legge essa sia definibile bosco.

Per un'area limitrofa di estensione pari a circa 1,08 ettari, sebbene la situazione dell'evoluzione forestale sia simile, il diverso inquadramento urbanistico (è al di fuori del perimetro del Parco del Mella) rende dubbio l'inquadramento ai sensi della normativa regionale e la conseguente possibilità di inserimento nel perimetro del PIF. Tuttavia si può affermare che l'area sia inquadrabile come bosco ai sensi della normativa nazionale e che pertanto l'eventuale eliminazione debba sottostare ad autorizzazione paesaggistica.

Sugli altri terreni di proprietà comunale e demaniale ERSAF ha effettuato il recupero forestale delle formazioni boschive già presenti, ricollegabili al c.d. Parco del Mella nell'area di via Sorbana, le quali mostravano in qualche caso segni di degrado ed in altri esigenze di trattamenti colturali finalizzati al miglioramento strutturale dell'impianto. Sono stati effettuati interventi di diradamento selettivo e pulizia e messa in sicurezza della componente arborea presente; in particolare si sono tagliate le piante che presentavano problemi di stabilità, quelle con problemi di carattere fitosanitario o dominate, al fine di ristabilire un equilibrio strutturale che miri a favorire un processo autonomo di rinnovazione.

Sono stati inoltre effettuati interventi di piantumazione sotto copertura all'interno di aree rade al fine di integrare la struttura originaria ed impedire l'ingresso delle specie alloctone, fortemente presenti sugli argini del fiume Mella.

La scelta delle specie impiegate per la realizzazione di boschi e fasce boscate si è ispirata agli impianti esistenti dell'età di circa vent'anni, nei quali a fronte di un'ampia varietà di specie impiegate, si è riscontrata a distanza di un ventennio una selezione che ha ridotto la composizione a poche specie, prevalentemente riconducibili all'acero campestre e montano, al frassino orniello e maggiore, al bagolaro, all'olmo, al carpino bianco, al ciliegio e alla rovere (poca), oltre ad un discreto conteggio di arbusti. Tutte le piante utilizzate erano provenienti dal Centro Vivaistico Forestale Regionale di Curno (BG), gestito da ERSAF, ed erano certificate per quanto riguarda la provenienza del materiale di propagazione.

Come ampiamente e dettagliatamente descritto nelle relazioni annuali, l'impianto dei boschi e delle fasce boscate è avvenuto nell'inverno-primavera 2015, mentre la manutenzione è stata effettuata, oltre che nel triennio previsto dal progetto 2015-2017, anche nel quarto anno dall'impianto (2018). L'anno di impianto è stato particolarmente problematico per la lunga stagione calda e siccitosa, ma gli sforzi manutentivi hanno ridotto la mortalità complessiva a livelli quasi fisiologici (12 %). Le fallanze sono state comunque risarcite nella primavera 2016.

Lo sviluppo degli anni post- impianto è stato rigoglioso, non si sono avvertiti fenomeni di fitotossicità evidenti, non si sono verificate defogliazioni o attacchi parassitari e i nuovi popolamenti arborei possono essere ora considerati pienamente affermati, anche se alcuni interventi di trinciatura tra le file e lungo le stesse potranno essere utili nei prossimi anni, anche per ragioni estetiche, considerato l'inserimento degli impianti in piena area urbana.

Nel 2017, per la realizzazione di un nuovo ossigenodotto interrato da parte della Società Air Liquide, necessario per garantire l'approvvigionamento di ossigeno all'Azienda Ori Martin, sono state divelte diverse piante di recente impianto, che Air Liquide ha provveduto a risarcire affidando alla stessa ERSAF il compito di effettuare le sostituzioni e di mantenerle attive per 3 anni. Le piante, sempre provenienti dal vivaio ERSAF di Curno, sono state messe a dimora nella primavera 2018 e sono state oggetto di specifiche cure colturali durante l'anno. I lavori di Air Liquide hanno anche provocato danni alle cortecce di numerosi alberi ascrivibili al Parco del Mella e quindi di circa vent'anni di età. I danni sono stati segnalati al Comune di Brescia e verificati nel corso di più sopralluoghi congiunti.

La mappa seguente (figura 6) illustra la dislocazione dei diversi interventi nel SIN in relazione alla tipologia d'intervento (non sono evidenziati i popolamenti di recente formazione posti nel settore più orientale delle aree agricole del SIN) mentre in tabella 4 sono illustrate le superfici corrispondenti a tutte le tipologie di boschi, fasce boscate e neoformazioni presenti all'interno del SIN.

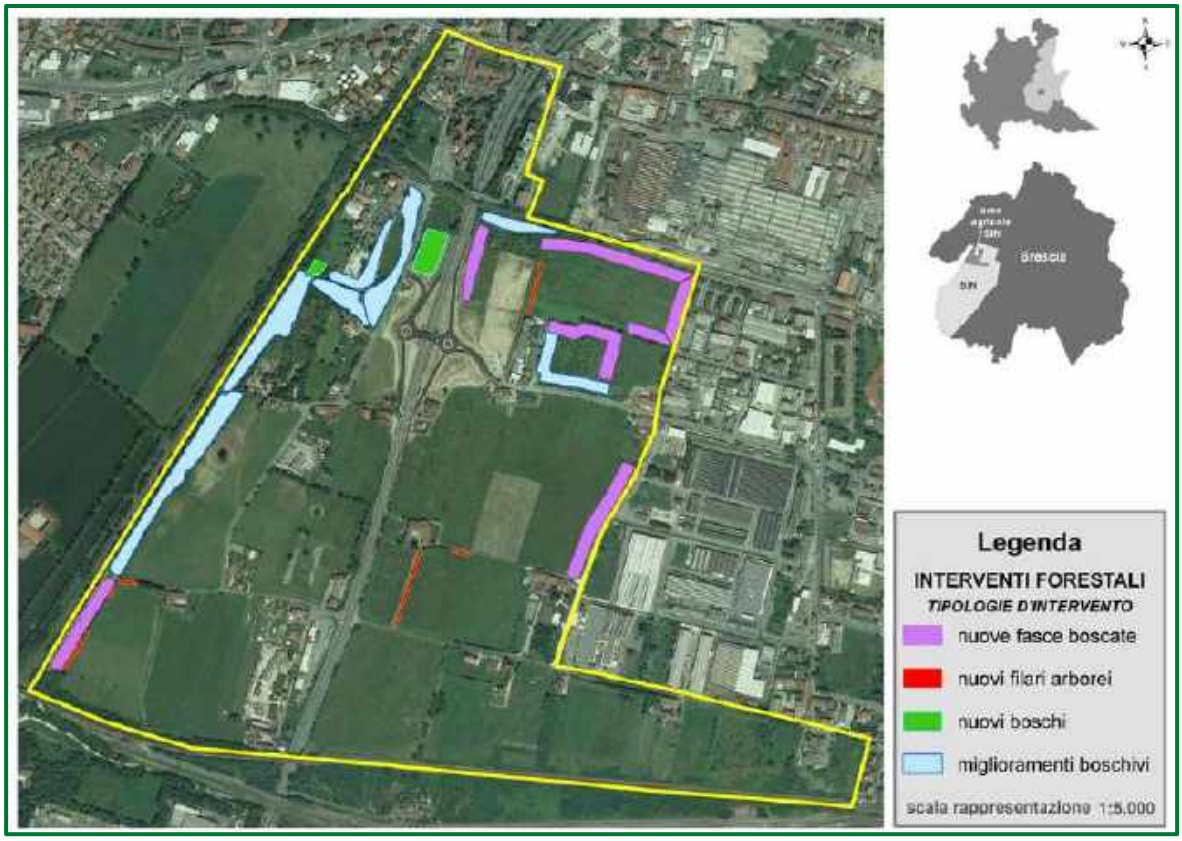


Figura 6: interventi forestali nel SIN distinti per tipologia

Tabella 4: riepilogo delle diverse tipologie di interventi forestali effettuati nel corso del progetto, e delle neoformazioni forestali esistenti, con relative superfici

TIPOLOGIA INTERVENTO	SUPERFICIE (ha)
Nuovi boschi realizzati	0,38
Nuove fasce boscate realizzate	2,50
Nuovi filari arborei realizzati	0,20
Miglioramento boschi esistenti	3,71
SUPERFICIE TOTALE INTERVENTI	**6,79**
Bosco di recente formazione segnalato all'UTR per l'inserimento nel PIF	1,49
Bosco di recente formazione non segnalato all'UTR in quanto di dubbia attribuzione	1,07
SUPERFICIE TOTALE AREE BOSCATE	**9,35**

In occasione del Primo Forum Mondiale sulle Foreste Urbane, organizzato dalla FAO a Mantova nei giorni 28 novembre – 1° dicembre 2018, ERSAF ha organizzato una serie di eventi denominati Camminaforeste Urbane 2018, realizzatisi in 26 diverse località urbane della Lombardia per sensibilizzare i cittadini lombardi sull'importanza delle foreste in città e per lanciare un messaggio al Forum per delle città sempre più verdi e vivibili. Il giorno 24 novembre 2018 il Camminaforeste Urbane è stato effettuato nelle aree di recente forestazione del SIN Brescia Caffaro, dove i numerosi cittadini bresciani partecipanti hanno potuto vedere le diverse realizzazioni di ERSAF nell'area.

3 Altre attività nel SIN "Brescia-Caffaro"

Collaborazioni con il Commissario Straordinario per il SIN "Brescia - Caffaro"

Con decreto del Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare prot. n. 178 del 10.08.2015 è stato nominato il Commissario Straordinario per il SIN "Brescia-Caffaro", nella persona del dott. Roberto Moreni.

Il Commissario nell'ambito delle sue competenze ha voluto affidare a ERSAF una serie di progetti e attività volti a indagare e approfondire il tema, con annesse problematiche, della presenza e/o possibilità di sviluppo di attività agricole in contesti contaminati come nel caso del SIN Caffaro; nei prossimi sottocapitoli viene fatto un breve riepilogo dei diversi progetti mentre nel capitolo 4 ci sarà un momento di sintesi in cui verranno evidenziati i vantaggi e le criticità delle diverse attività indagate al fine di individuare le alternative che, a giudizio di ERSAF, sulla base dell'esperienza acquisita sul campo in questi anni di lavoro e tenendo in considerazione anche gli aspetti agronomici, possono essere le più idonee per rispondere alla volontà di mantenere forme attive di agricoltura nel contesto del SIN Caffaro.

A tale riguardo è opportuno fare un richiamo alle ordinanze sindacali attualmente vigenti che impongono limiti e divieti allo svolgimento di attività agricole su terreni impattati dalla contaminazione "Caffaro".

3.1 Ordinanze sindacali finalizzate all'imposizione di alcuni limiti all'utilizzo del territorio e allo svolgimento di attività agricole nel SIN "Brescia - Caffaro"

Si ricorda che a partire dalla scoperta del "caso Caffaro", nel 2001, sono state via via emanate una serie di ordinanze sindacali, a tutela della salute pubblica, dapprima da parte del Comune di Brescia e in seguito da altre amministrazioni comunali interessate dalla stessa problematica, al fine di regolamentare, anche con l'imposizione di prescrizioni, limiti e divieti, l'utilizzo del territorio e, in particolare ai fini di nostro interesse, lo svolgimento di attività agricole nelle aree impattate dalla contaminazione "Caffaro".

In particolare attualmente, per le aree agricole interne al perimetro terreni del SIN, è vietata qualsiasi forma di agricoltura (cfr. "*il divieto di coltivazione di cereali e vegetali in genere, con esclusione del divieto alle coltivazioni previste dal progetto in corso di sperimentazione sul passaggio degli inquinanti dai suoli alle essenze vegetali a cura di ERSAF ed ATS o promossi*

o autorizzati direttamente dal Commissario Straordinario" estratto dall'Ordinanza sindacale del Comune di Brescia valida per il periodo 01 luglio - 31 dicembre 2018).

Vi sono poi diverse centinaia di ettari di aree agricole, poste a sud della linea ferroviaria Milano-Venezia, impattate dalla contaminazione "Caffaro" (come attestato dalle indagini ARPA) e soggette a ordinanze sindacali di più Comuni, che pongono alcune limitazioni e prescrizioni allo svolgimento di attività agricole al loro interno.

Su questo tema dello svolgimento di attività agricole in aree contaminate "Caffaro", con tutte le implicazioni che comporta, è stato aperto fin dal 2014 un apposito tavolo tecnico, di cui per i dettagli si rimanda al par. 5.3.

In questo contesto ERSAF è stato coinvolto nel 2014 per dare il suo contributo, in collaborazione con la Provincia di Brescia Settore Agricoltura e l'IZSLER, alla stesura di un documento riportante delle linee guida per la corretta raccolta del trinciato di mais, nonché nel 2015, insieme ad altri componenti del tavolo tecnico sopra citato, per dare prescrizioni circa l'utilizzo dell'acqua fluente nelle rogge per l'irrigazione dei campi e le pratiche di curagione dei fossati.

3.2 Progetto "Passaggio contaminanti nelle produzioni agricole"

Nel corso del 2016, su spinta e incarico del Commissario (propria nota prot. n. 00010 del 20/10/2015), è stato realizzato un progetto, insieme all'ATS Brescia, per valutare il passaggio dei contaminanti nelle produzioni agricole coltivate all'interno del SIN "Brescia-Caffaro".

Va detto che questo progetto era stato preceduto, nel 2015, da una prova di coltivazione di mais condotta da ERSAF in accordo con l'ASL su un terreno dell'azienda agricola Antonioli, ubicato in una delle zone che dalla caratterizzazione di Fase 3 era risultata fra le più contaminate tra le aree agricole del SIN. Questa prova aveva dato esiti positivi in quanto la granella di mais, campionata dall'ASL e fatta analizzare presso il laboratorio dell'IZSLER di Brescia era risultata non contaminata rispetto ai limiti fissati per l'alimentazione umana e animale.

Questa prima prova ha dunque stimolato l'interesse per approfondire questa tematica che ha effettivamente avuto seguito con il progetto, ben più articolato, sviluppato nel 2016. Per questo progetto ERSAF ha impostato e seguito la parte agronomica riguardante le coltivazioni mentre l'ATS ha curato gli aspetti di verifica analitica sui prodotti agricoli. Nello specifico, partendo dalla situazione in essere nelle aree soggette a ordinanza sindacale che limita le attività agricole in alcune aree della città e dei comuni limitrofi a sud del SIN, si è deciso di

testare alcune coltivazioni fra quelle già consentite dall'ordinanza e quelle potenzialmente più interessanti per una loro reintroduzione dal punto di vista sia del contesto agronomico sia economico, nell'ottica di valutare la loro compatibilità a un loro utilizzo anche nelle aree agricole all'interno del SIN.

L'elenco delle coltivazioni testate è di seguito riportato.

Specie di interesse alimentare o zootecnico (c.d. "food" o "feed"):

- Frumento tenero (*Triticum aestivum*)
- Orzo (*Hordeum vulgare*)
- Triticale (*x Triticosecale*)
- Mais da trinciato (*Zea mays*)
- Soia (*Glycine max*)

Specie aventi anche interesse come prodotti non alimentari o zootecnici (nelle filiere c.d. "no-food"):

- Canapa da fibra e da granella (*Cannabis sativa*)
- Girasole (*Helianthus annuus*)

Lo schema sperimentale ha previsto, come detto sopra, la coltivazione di n. 7 specie vegetali e per ogni specie sono state approntate n. 3 parcelle di superficie pari a 100 m^2 (10 x 10 m), per un totale dunque di **n. 21 parcelle**.

La planimetria della disposizione delle parcelle è quella indicata nella seguente mappa in fig. 7.



Figura 7: schema della disposizione in campo delle 21 parcelle sperimentali

Per ogni parcella è stato previsto un campionamento e relativa analisi del terreno, in modo da avere un'informazione di dettaglio sui livelli di concentrazione delle sostanze contaminanti di interesse che nel caso specifico (contaminazione di origine "Caffaro") sono state valutate essere: PCB, PCDD/F e metalli pesanti (con particolare attenzione a As e Hg).

Analoghi campionamenti e analisi sono stati previsti per le biomasse vegetali cresciute nelle parcelle; in particolare per ogni specie è stata campionata e analizzata solamente la parte della pianta che ha poi normalmente un utilizzo commerciale (es. granella, semi, trinciato). Il momento della raccolta si è dunque deciso per ogni specie in coincidenza con il giusto grado di maturazione del prodotto da ottenere da quella pianta. L'obiettivo in questo caso era quello di ottenere dati specifici sui livelli di contaminazione dei prodotti agricoli; conoscere anche i relativi livelli di contaminazione dei terreni dove le piante sono state coltivate ha consentito di fare alcune valutazioni più precise sui rapporti fra la contaminazione dei terreni e il passaggio dei contaminanti nelle produzioni agricole.

Riassumendo, le analisi sui prodotti vegetali coltivati all'interno del SIN Brescia Caffaro, pur mostrando la conformità di tutti i prodotti per un uso zootecnico, hanno mostrato differenze nei livelli di contaminazione anche all'interno della stessa specie.

Questo aspetto è degno di approfondimento poiché potrebbe derivare da un differente assorbimento radicale, seppur contenuto, o da maggiore o minore possibilità di insudiciamento con il terreno, per le caratteristiche intrinseche del vegetale, durante la coltivazione o nelle fasi di raccolta.

Sulla base delle risultanze analitiche ottenute nell'ambito di questo progetto, l'ipotesi di restituzione dell'area "SIN Brescia Caffaro" all'agricoltura potrebbe prevedere ad oggi la reintroduzione delle coltivazioni di frumento, orzo, triticale e mais per la raccolta della sola granella e di girasole per i semi, con il vincolo di effettuare le analisi del prodotto che ne confermi l'idoneità all'uso zootecnico. Anche il mais per trinciato potrebbe essere reintrodotto con il vincolo del taglio a non meno di 50 cm dal suolo, così come effettuato durante la sperimentazione.

La variabilità analitica registrata nella soia merita un opportuno approfondimento e non consente al momento di proporla per la reintroduzione nell'area SIN.

Sia il seme che il fusto della canapa hanno mostrato delle criticità che ne sconsigliano la reintroduzione in area SIN.

La Relazione finale (già allegata alla Relazione annuale 2016) è stata trasmessa al Commissario, a firma congiunta di ERSAF e ATS Brescia, in data 28/02/2017. I risultati del progetto sono stati illustrati al pubblico in occasione di un convegno organizzato ad hoc presso la sede dell'ATS di Brescia il giorno 21/03/2017.

3.3 Prove agronomiche di agricoltura conservativa

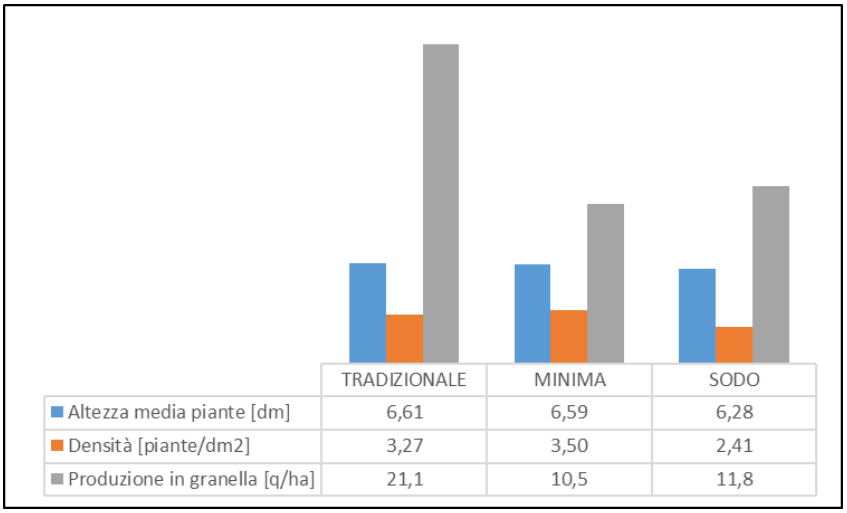
Nell'ambito della sperimentazione per il passaggio dei contaminanti nelle produzioni agricole sono state inserite prove agronomiche rispondenti ai principi della cosiddetta agricoltura conservativa, ovvero tutte quelle pratiche che comportano minime lavorazioni del suolo e consentono alcuni vantaggi come: copertura permanente del suolo, limitazione e controllo dell'erosione e del ruscellamento, minimo sollevamento di polveri. L'obiettivo, nel caso specifico, era quello di promuovere un eventuale riutilizzo agricolo dei suoli del SIN nella prospettiva della attesa emanazione del Decreto ministeriale recante il regolamento relativo agli interventi di bonifica in aree agricole. Pertanto nel 2017 si è proceduto al monitoraggio dello sviluppo vegetale delle specie *Festuca arundinacea* e *Triticum aestivum* (frumento tenero), seminate nel novembre 2016 su 6 parcelle e gestite secondo le seguenti tecniche: tradizionale, lavorazione minima e semina su sodo (vedi figura 8).



Figura 8: schema delle parcelle delle prove di agricoltura conservativa

Le pratiche agricole sopra dette sono anche caratterizzate da una differente resa. Ne consegue che deve necessariamente essere verificata la sostenibilità economica delle scelte adottate, in quanto l'elemento reddituale rimane di fondamentale importanza al fine di garantire un presidio attivo sulle aree del SIN.

A tal fine, per il frumento, subito prima della raccolta, sono state eseguite alcune misurazioni in campo dei principali dati biometrici (altezza media e densità delle piante) su ciascuna delle 3 parcelle in modo da ottenere parametri per il confronto degli effetti delle diverse tecniche adottate sulla crescita delle piante. Inoltre, alla trebbiatura (eseguita a inizio luglio) sono stati raccolti ulteriori dati sul peso della produzione in granella di ciascuna parcella. I risultati ottenuti da queste misurazioni di campo sono sintetizzati nella seguente figura 9.



	TRADIZIONALE	MINIMA	SODO
Altezza media piante [dm]	6,61	6,59	6,28
Densità [piante/dm2]	3,27	3,50	2,41
Produzione in granella [q/ha]	21,1	10,5	11,8

Figura 9: Risultati delle misurazioni di campo per *Triticum aestivum*

In generale, nello sviluppo vegetativo la parcella seminata su sodo ha mostrato risultati peggiori con piante mediamente più basse e, soprattutto, con una densità inferiore che ha portato ad una perdita di circa il 30% di piante. Per quanto riguarda la produzione di granella, in tutte le parcelle è risultata essere mediamente bassa, soprattutto in virtù dell'assenza di apporti irrigui dovuta a vincoli logistici (mancanza di un punto di approvvigionamento idrico nelle vicinanze). In ogni caso, come atteso al primo anno di sperimentazione di tecniche in minima o assenza di lavorazione per una coltura autunno-vernina, la produzione in granella nella parcella sviluppata secondo la tecnica colturale tradizionale è risultata essere circa il doppio di quella nelle altre 2. È altresì ipotizzabile che in tempi più lunghi e in condizioni ottimali di crescita le differenze produttive nella coltivazione del frumento si attenuino, esaltando gli aspetti positivi dell'applicazione di tecniche conservative: infatti il sistema suolo-coltura necessita di tempo per raggiungere un nuovo equilibrio e al tempo stesso occorre riadattare e riorganizzare le pratiche colturali in funzione delle condizioni produttive e pedoclimatiche sito-specifiche.

3.4 Attività di approfondimento su coltivazioni destinate alla produzione di biomasse

Nel 2016 è iniziata, con il benestare del Commissario Straordinario (vedi nota prot. n. 12/2016 del 29/02/2016), una collaborazione con il DiSAA (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia) dell'Università di Milano e con Biochemtex Agro, un'azienda privata operante nel settore delle agroenergie e della chimica verde, per valutare le potenzialità

della coltivazione di specie atte alla produzione di biomasse in un contesto di terreni considerati marginali, quali quelli contaminati del SIN Caffaro.

Le attività in campo sono iniziate nel 2017, secondo un disegno sperimentale che ha previsto la realizzazione di 9 parcelle dove testare due specie vegetali, Arundo donax e Panicum virgatum, più un controllo, ognuna in triplicato (vedi figura 10).



Figura 10: immagine ripresa con drone delle 9 parcelle sperimentali

All'inizio delle attività è stato effettuato un campionamento dei terreni delle parcelle, per conoscerne i livelli di contaminazione. Al termine del 1° e del 2° anno sono stati eseguiti dei campionamenti random di alcune piante in ciascuna parcella per le valutazioni biometriche e per le analisi chimiche sull'eventuale assorbimento di contaminanti nelle diverse parti della pianta. Al termine del 2° anno inoltre è stato effettuato un campionamento sul trinciato di Arundo, nell'ipotesi di destinare questo prodotto alla produzione di biogas.

Attualmente di tutti i campionamenti sopra citati sono state fatte le analisi chimiche, a cura dell'Università, solo sui campioni di terreno prelevati a inizio sperimentazione e sui vegetali raccolti al termine del 1° anno e solo per la ricerca dei metalli. Questo a causa di una mancanza di risorse dovuta al fatto che purtroppo, verso la fine del 2017, la società Biochemtex Agro ha abbandonato il progetto per motivi finanziari (è entrata in concordato preventivo). Questo ritiro è stato un duro colpo per il progetto perché Biochemtex Agro era il

soggetto che non solo si era impegnato e aveva messo a disposizione una certa quota necessaria per coprire i costi delle analisi ma soprattutto, in ottica di sviluppi futuri, garantiva un interesse commerciale per i prodotti agricoli coltivati e faceva intravedere la nascita di una potenziale filiera agroindustriale.

Ciononostante bisogna riconoscere che il gruppo dell'Università di Milano continua a mostrare interesse e credere nelle potenzialità di questa sperimentazione, tanto che si è assunto l'onere di svolgere comunque con proprie risorse alcune delle analisi previste, e intende continuare a seguire le coltivazioni dal punto di vista agronomico.

Il gruppo di ERSAF che segue questo progetto ritiene, in sintonia con il gruppo dell'Università, che questo filone di ricerca debba essere approfondito in quanto questo tipo di attività può rappresentare una delle soluzioni ambientalmente ed economicamente possibili e più interessanti per il ritorno delle attività agricole all'interno del SIN (vedi par. 4.3).

3.5 Progetto "Orto Sperimentale" in campo e "Studio delle polveri" sollevate da attività agricole

Questo progetto è nato, su incarico del Commissario, come prosecuzione ed estensione in campo del Progetto c.d. "Orto Sperimentale" realizzato nell'ambito della Convenzione stipulata in data 08/05/2013 tra Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Regione Lombardia e l'Istituto Superiore di Sanità concernente l'attuazione delle attività relative all'intervento alla lettera M) dell'Accordo di Programma sottoscritto il 29/09/2009, relativo al Sito di bonifica di Interesse Nazionale "Brescia-Caffaro" e riguardanti "valutazioni epidemiologiche e attività di biomonitoraggio e monitoraggio delle matrici ambientali". Di seguito si riportano in breve le principali caratteristiche delle attività, svolte nel corso del 2017, nell'ambito di ciascun progetto; per ulteriori dettagli si rimanda alla relazione finale del progetto.

3.5.1 Progetto "Orto Sperimentale" in campo

Con nota prot. n. 21/2017 del 02/03/2017 il Commissario ha comunicato di voler dare l'incarico a ERSAF e ATS Brescia, per realizzare il progetto che attiene la coltivazione in campo degli ortaggi già sperimentati in vaso. L'obiettivo del Progetto è stato quello di valutare il potenziale trasferimento suolo-pianta in diverse specie ortive di alcuni tipici contaminanti presenti nei suoli del SIN Brescia-Caffaro; l'esperimento è stato condotto in pieno campo in un'area del SIN caratterizzata da un elevato livello di contaminazione dei suoli al fine di simulare in modo più realistico le condizioni reali di un orto privato gestito secondo le pratiche

comuni della zona. Nel corso del 2017 sono quindi state allestite 12 parcelle in campo su cui sono stati coltivati i seguenti ortaggi: zucchina (in due modalità diverse: normale e con pacciamatura), prezzemolo, spinacio, fagiolino, lattuga, peperone, radicchio rosso, verza, carota, pomodoro e patata. Contemporaneamente ogni specie è stata coltivata anche su terreno "pulito" all'interno di cassoni in plastica posti in adiacenza alle parcelle. Il terreno delle parcelle in campo e quello utilizzato nei cassoni è stato campionato da ERSAF e successivamente fatto analizzare. Durante tutto l'anno sono state eseguite tutte le operazioni colturali previste per ciascuna specie ortiva e i relativi campionamenti delle frazioni edibili (da parte di personale ATS Brescia) man mano che giungevano a maturazione. L'attività si è conclusa a inizio dicembre 2017, con l'esecuzione dell'ultima campagna di campionamento di vegetali.

I risultati analitici di questo studio sul trasferimento degli inquinanti dal suolo alle essenze orticole hanno mostrato una situazione eterogenea con diverse criticità per la coltivazione di: carota (non sbucciata), patata (non sbucciata), lattuga, prezzemolo, radicchio rosso e spinacio. Tutte queste essenze sono risultate contaminate da più di un POP. Come già evidenziato nello studio precedente dell'orto sperimentale in serra, l'assorbimento da parte delle piante di POPs dipende dalle proprietà chimico fisiche di ciascun congenere e dalle caratteristiche del suolo.

Per fagiolini, peperone e zucchina, sia pacciamata che non pacciamata, i risultati analitici hanno mostrato lievi superamenti dei limiti specifici per cui si è deciso di eseguire un supplemento di indagine analitica a cura di IZSLER per escludere una possibile contaminazione crociata all'origine dell'esito di non idoneità di tali ortaggi; questa verifica ha confermato i dati precedenti.

Pertanto le uniche due essenze che sono risultate indenni da contaminazione sono state verza e pomodoro, per le quali l'ordinanza sindacale del Comune di Brescia, a partire dal I semestre 2019, a seguito di parere positivo da parte dell'ATS di Brescia, ne consente la loro coltivazione negli orti presenti all'interno del SIN Caffaro.

Nel 2018 è proseguita l'attività dell'orto sperimentale in campo con la coltivazione di nuovi ortaggi e la ripetizione per alcune essenze già coltivate nel 2017; in particolare sono state riseminate carote e patate, con la finalità di verificare se la presenza di inquinanti oltre i limiti consentiti dipendesse dalla mancata sbucciatura, oltre a peperone, fagiolino e zucchina, risultate non conformi ma oggetto di ricontrollo analitico con la finalità di verificare la possibilità di reinserimento nella coltivazione orticola del SIN senza rischi per la salute degli ortolani e dei consumatori.

Inoltre sono state seminate altre 12 essenze (aglio, cipolla, pisello, ravanello, porro, fragola, melanzana, cetriolo, fagioli, basilico, cavolfiore, finocchi) precedentemente non testate né nell'orto sperimentale in serra né in quello in campo attivato nel 2017, con la finalità di verificare anche per queste la possibilità di reinserimento nella coltivazione orticola del SIN senza rischi per la salute degli ortolani e dei consumatori. I campionamenti si sono protratti fino alla fine di novembre perciò le analisi al momento sono in corso e i risultati saranno disponibili nei primi mesi del 2019.

3.5.2 "Studio delle polveri" sollevate da attività agricole

La seconda attività prevista dal progetto ha riguardato la valutazione dell'impatto ambientale e sanitario delle lavorazioni del terreno e delle diverse forme con cui queste possono essere attuate nelle aree agricole all'interno del SIN "Brescia-Caffaro" (cfr. il par. 3.3). Al fine di approfondire gli aspetti legati alla criticità di effettuare lavorazioni agricole in terreni contaminati si sono quindi messe a confronto due diverse tipologie di lavorazioni agricole dei terreni ovvero:

- lavorazione tradizionale;
- minima lavorazione.

Pertanto nel corso del 2017 sono state coltivate a sorgo (*Sorghum bicolor*, varietà little giant) due parcelle, una per ogni tipologia di lavorazione, ed è stato effettuato un monitoraggio della qualità dell'aria e in particolare del contenuto di polveri tramite apposite misurazioni mediante centraline e campionatori durante l'esecuzione delle principali operazioni colturali (preparazione del letto di semina, semina e raccolta) (vedi Relazione di aprile 2018 della U.O.C di Medicina del Lavoro, Igiene, Tossicologia e Prevenzione Occupazionale dell'ASST Spedali Civili di Brescia allegata al Progetto orto sperimentale). Lo studio ha consentito di raggiungere 2 diversi obiettivi:

1. valutare quali siano le modalità operative che consentono di minimizzare il sollevamento di polveri e quali invece risultino più impattanti da questo punto di vista;
2. valutare l'impatto sanitario derivante dall'esposizione inalatoria a polveri e composti organici policlorurati persistenti durante le operazioni di lavorazione del terreno nel SIN Caffaro.

I risultati di questo studio hanno mostrato da una parte come il rischio sanitario per un operatore esposto (addetto alla guida del trattore) sia risultato in tutte le condizioni sempre accettabile, dall'altra come i diversi tipi di lavorazione del terreno non influiscano più di tanto

sulla quantità di polveri prodotte e misurabili in aria. Va comunque sottolineato come queste misurazioni non tengano conto del fatto che utilizzando pratiche di agricoltura conservativa è ridotto il numero complessivo di operazioni di lavorazione/preparazione del terreno, fatto questo che da solo evidentemente incide sulla quantità di polveri prodotte.

3.6 Rogge

3.6.1 Studio dei percorsi

Uno degli aspetti che fin da subito ERSAF ha ritenuto di estrema importanza approfondire è quello che riguarda le rogge, considerata la natura agricola degli interventi e delle proposte che era chiamato a svolgere nel contesto del SIN Caffaro. È evidente infatti come qualsiasi intervento o soluzione di tipo agricolo debba necessariamente tenere conto della disponibilità o meno di acqua. Per questi motivi ERSAF ha condotto, relativamente al perimetro delle aree agricole del SIN (ma non solo), uno studio approfondito sui percorsi delle rogge, sulla classificazione fra i diversi tipi di canali (rogge, fossi adacquatori), sui manufatti idraulici (paratoie) e una ricostruzione storica, basata su interviste agli agricoltori e ai proprietari di terreni, per ricostruire l'utilizzo dell'acqua sui diversi terreni, le direzioni di scorrimento, i punti di approvvigionamento e di adacquamento, etc..

Il frutto degli approfondimenti di cui sopra, rappresentato nella tavola 2, è servito a orientare le indagini di caratterizzazione di cui alla Fase 2, integrare le informazioni utilizzate per la realizzazione delle mappe di spazializzazione della contaminazione e più in generale a migliorare la conoscenza sui percorsi delle rogge e dell'acqua nelle aree agricole del SIN, cosa che potrà tornare sicuramente utile qualora dovesse essere valutato un ritorno all'irrigazione di queste aree e che fin d'ora può essere utilizzata per un aggiornamento e un perfezionamento del modello concettuale del SIN.

3.6.2 Approfondimenti sulla storia irrigua delle aree agricole interne al SIN e valutazioni a seguito di indagini integrative su alcuni terreni

Gli approfondimenti effettuati presso il Consorzio della Fiumicella, l'Archivio di Stato di Brescia e il Consorzio Federativo del Mella hanno permesso di rilevare quali fossero in passato le aree irrigate dalla roggia Fiumicella (originata dal Vaso Fiume Grande e quindi dal Mella) e quelle un tempo riferite alla roggia Franzagola, nella quale venivano riversate le acque di scarico dello stabilimento Caffaro e che pertanto hanno subito una maggiore contaminazione (vedi figura 11).



Figura 11: rappresentazione delle aree irrigate dal consorzio Roggia Fiumicella

Tali considerazioni derivanti da elementi storici sembrano trovare conferma in alcuni dati analitici riferiti alle medesime aree poste nella porzione settentrionale del compendio agricolo del SIN e mai irrigate con acque provenienti dallo stabilimento Caffaro, quali ad esempio la caratterizzazione, con esito a norma di colonna A della tab. 1 allegato 5, Titolo V, Parte Quarta del d.lgs 152/2006, effettuata da Retragas (Gruppo A2A) per la costruzione, in via Sorbana, di una centrale di scambio del gas metano, i cui lavori sono stati avviati nell'estate 2014.

Questi elementi hanno portato ERSAF a ritenere di notevole rilevanza un approfondimento di indagine su alcuni terreni rappresentativi delle aree che si ritiene non siano mai state irrigate con acque provenienti dallo stabilimento Caffaro. Per questo ERSAF, a ottobre 2018, ha condotto un'indagine integrativa (in figura 12 si rappresentano le aree) mediante un campionamento dei suoli realizzato secondo i seguenti criteri:

- i terreni sono stati tenuti distinti per le diverse proprietà;
- si sono individuati n. 8 lotti di circa 1 ha di superficie;
- 7 degli 8 lotti rientrano nelle aree storicamente irrigate dalla roggia Fiumicella, mentre per l'ottavo (il n. 5) è dimostrato l'uso irriguo di acque provenienti dallo stabilimento Caffaro;
- per ogni lotto sono stati prelevati dai 5 agli 8 campioni elementari a costituire 1 campione composito rappresentativo del lotto;

- la profondità di campionamento è stata di 40 cm dal p.c., analogamente alla caratterizzazione di Fase 3 (vedi par. 2.6.1.3);
- il pacchetto analitico richiesto al laboratorio è stato lo stesso di quello utilizzato per la sperimentazione e le parcelle in campo.

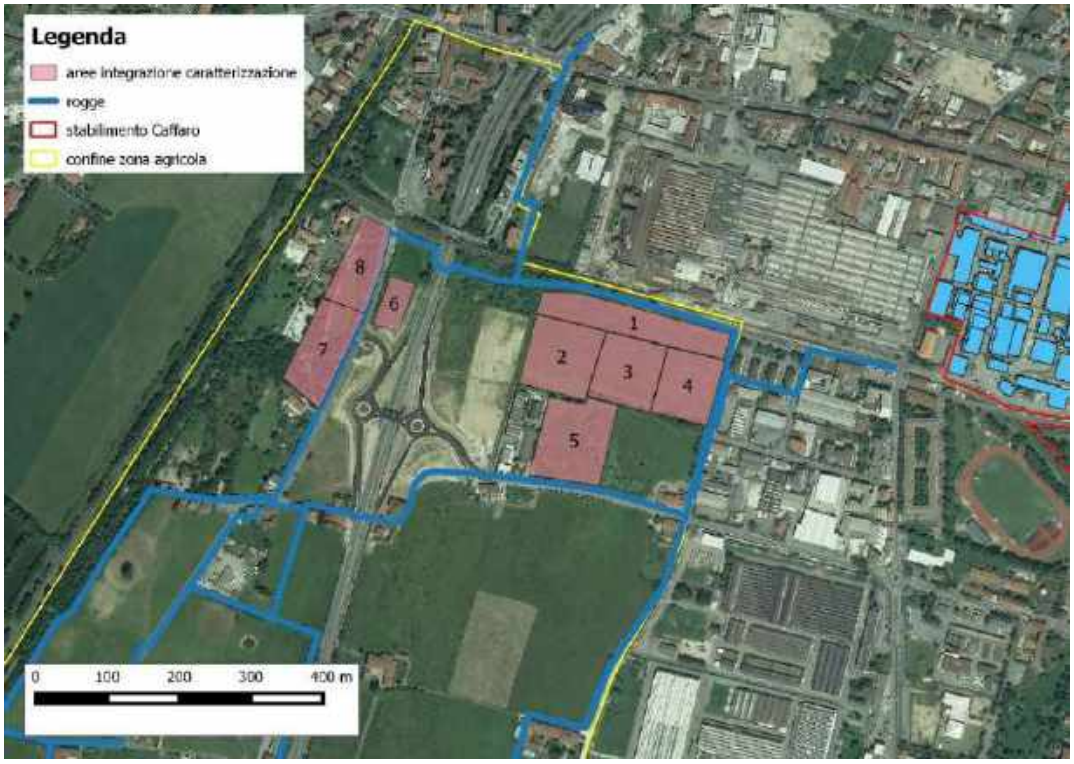


Figura 12: aree oggetto di indagine integrativa

I risultati analitici sono pervenuti dal laboratorio in data 18/12/2018 (vedi tabella 5).

Tabella 5: sintesi dei risultati analitici dei campioni delle indagini integrative

parametro		**Arsenico**	**Mercurio**	**PCB totali**	**PCDD/F TEQ (TEF NATO 1988)**
u.m.		mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	µg/kg s.s.	ng/kg s.s.
lim. tab.1/A 152/06		20	1	60	10
Lotto	1	16,0	0,26	354	26
	2	15,2	0,22	261	20
	3	19,0	0,27	335	33
	4	17,2	0,29	525	33
	5	61,7	2,86	2526	280
	6	20,4	1,00	235	57
	7	17,9	0,27	99	15
	8	16,8	0,24	124	13

Da una prima valutazione degli stessi si possono trarre alcune considerazioni, espresse di seguito:

I. il lotto n. 5, l'unico che a quanto ci risulta è stato irrigato con acque provenienti dalla Caffaro, presenta valori di PCB e PCDD/F circa 10 volte superiori a quelle riscontrate negli altri lotti. Inoltre è l'unico in cui le concentrazioni di As e Hg sono abbondantemente sopra i limiti di col. A della tab. 1 del 152/2006;

II. i restanti 7 lotti sono caratterizzati da concentrazioni di PCB e PCDD/F comunque superiori ai limiti di col. A della tab. 1 del 152/2006, pur con valori rientranti nell'intervallo di concentrazioni più basso fra i campioni riferiti ad altre aree agricole del SIN (confronto con i dati di Fase 3 e con le parcelle del progetto "Passaggio contaminanti");

III. gli stessi 7 lotti di cui al punto precedente non presentano però superamenti dei limiti di legge sopra citati né per As né per Hg (tranne in un unico caso per l'As, con un lievissimo supero).

Queste informazioni si ritiene siano di notevole rilevanza, in particolare perché emerge una situazione nuova, che merita sicuramente degli approfondimenti, che non troverebbe del tutto spiegazione nel modello concettuale finora utilizzato per le aree agricole del SIN. Nello specifico si rileva che per 7 degli 8 lotti non viene confermata l'associazione fra i contaminanti caratteristici del SIN (il cd. "cocktail Caffaro") ovvero alla contaminazione da PCB e PCDD/F non corrisponde la contaminazione da As e Hg.

L'altro elemento degno di approfondimento è rappresentato dal fatto che comunque i 7 lotti sopra citati, che dalle ricostruzioni fatte da ERSAF sul reticolo delle rogge non risulta siano mai stati bagnati dalle acque provenienti dallo stabilimento Caffaro, presentino comunque concentrazioni significative di PCB e PCDD/F, situazione difficilmente spiegabile allo stato attuale delle conoscenze.

3.6.3 Relazioni con SOGESID

Al fine di garantire il ripristino della funzionalità irrigua della rete di rogge presenti nella porzione agricola del SIN, sono state fatte alcune verifiche, approfondimenti ed incontri attraverso i quali è stata formulata una proposta di modifica delle priorità di messa in sicurezza delle rogge affidata a SOGESID. Dopo un primo incontro svoltosi presso il Comune di Brescia è stata inviata una proposta con nota prot. ERSAF.2013.0016493 del 11/09/2013, nella quale

venivano descritti i tratti di rogge da integrare nel progetto per il ripristino della funzionalità irrigua nell'area.

La proposta è stata recepita non nei termini di modifica della ipotesi originaria contenuta nell'AdP, bensì in sede di riparto delle nuove risorse messe a disposizione del MATTM, prevedendo pertanto una estensione della convenzione tra MATTM e SOGESID.

È stata segnalata a SOGESID, dopo una verifica del progetto definitivo presentato a novembre 2014, la necessità di integrare la progettazione con la previsione di manufatti di derivazione (paratoie), proprio per garantire la possibilità di irrigazione futura dei terreni. La problematica è stata evidenziata alla Società nel corso di un incontro svoltosi a Roma il 13 novembre 2014. Tale indicazione è stata fatta propria e ribadita da Regione Lombardia nel corso della Conferenza di servizi istruttoria del 10 dicembre 2014, nella quale si è pertanto stabilito di integrare il progetto.

3.7 Considerazioni

Da tutte le esperienze citate nei precedenti paragrafi si può generalmente dire che lo svolgimento di attività agricole su terreni contaminati non dovrebbe essere vietato a priori, ma possa essere quantomeno preso in considerazione con i dovuti accorgimenti e se adeguatamente controllato/monitorato.

L'esperienza del passaggio dei contaminanti nelle produzioni agricole ha dimostrato che diverse colture, sebbene coltivate su terreni anche fortemente contaminati, possono essere condotte ottenendo prodotti salubri, indenni da contaminazione. Le stesse considerazioni si possono trarre dal progetto dell'orto sperimentale, anche se limitatamente a un numero più ristretto di essenze vegetali.

Ciò detto, in aree fortemente contaminate come quella del SIN Caffaro, rimane d'obbligo sottolineare la necessità di contenere quanto più possibile le esposizioni per inalazione e contatto dermico agli inquinanti dei lavoratori addetti all'agricoltura e limitare la diffusione aerea di inquinanti per la tutela della popolazione e dell'ambiente (vedi paragrafi 3.3 e 3.5.2).

A tale proposito si evidenzia che diversi aspetti legati ad attività agricole possono determinare situazioni di maggiore rischio: ad esempio le lavorazioni del terreno implicano una movimentazione dello stesso con conseguente sollevamento di polveri e accelerazione dei processi di ossidazione della sostanza organica (si ricorda che in particolare PCB e PCDD/F sono legati al carbonio organico presente nel suolo) e inoltre terreni lavorati sono

maggiormente soggetti a fenomeni di erosione, ruscellamento e dilavamento con conseguente trasporto di materiale potenzialmente contaminato al di fuori del sito.

In quest'ottica si ritiene opportuno valutare la possibilità di utilizzare pratiche di agricoltura conservativa, quali minime lavorazioni o semina su sodo, in alternativa alle tecniche di agricoltura tradizionale (vedi par. 3.2). Un'altra possibilità, sempre nell'ottica di limitare la produzione di polveri e i fenomeni di erosione e ruscellamento conseguenti al lasciare il terreno nudo, è data dalle coltivazioni poliennali che per loro natura evidentemente non comportano lavorazioni annuali del suolo e garantiscono una copertura permanente dello stesso (fra queste colture si ricorda ad es. l'Arundo donax, vedi anche il par. 3.4).

Il rischio sanitario connesso con la presenza di aree agricole contaminate è una problematica ad oggi non ancora risolta in quanto mancano i valori di riferimento specifici per i suoli a destinazione d'uso agricolo, mancano gli standard di qualità per le acque ad uso irriguo, solo alcuni limiti massimi per alcuni analiti sono ad oggi stati normativamente definiti.

L'emanazione del Decreto ministeriale recante il "Regolamento relativo agli interventi di bonifica, ripristino ambientale e di messa in sicurezza d'emergenza, operativa e permanente delle aree destinate alla produzione agricola e all'allevamento", ai sensi dell'art. 241 del D.Lgs 152/2006, aiuterebbe a meglio definire le condizioni per l'eventuale scelta del ritorno all'agricoltura all'interno del SIN.

4 Scenari futuri

Alla luce dell'esperienza e della conoscenza del territorio maturate in questi anni di lavoro, avendo avuto l'opportunità di approfondire diversi aspetti legati alla presenza di attività agricole in un contesto problematico come quello delle aree contaminate del SIN Caffaro, tenuto conto delle competenze specifiche di ERSAF in tema di agricoltura, si elencano di seguito una serie di opzioni sul possibile utilizzo futuro di questa parte di territorio, comprensive di una disamina sui principali vantaggi, svantaggi, punti di forza e di debolezza, opportunità e criticità che ognuno di questi scenari comporterebbe.

Prima di esporre i diversi scenari si ritiene tuttavia fondamentale, per consentire una corretta e completa analisi della situazione, elencare una serie di elementi e questioni che rivestono una notevole importanza nel processo decisionale per la scelta dello scenario.

A. PROCEDIMENTO AMMINISTRATIVO

Si evidenzia come ad oggi per le aree agricole del SIN Caffaro non sia ancora stato aperto ufficialmente un procedimento di bonifica. Inoltre andrebbe chiarito se debba essere aperto un singolo procedimento per ogni proprietà. Si evidenzia inoltre che al momento per queste aree non sia disponibile una caratterizzazione eseguita e approvata ai sensi di legge, passaggio fondamentale senza il quale è preclusa la possibilità di eseguire interventi di bonifica.

B. DISPONIBILITÀ DELLE AREE

Attualmente la maggior parte dei terreni agricoli è di proprietà privata, e questo comporta che:

- attualmente qualsiasi tipo di iniziativa e/o intervento è demandato ai singoli proprietari;
- deve essere attentamente valutato se un intervento sostitutivo da parte del pubblico può essere attuabile;
- può essere valutato un eventuale acquisto delle aree da parte del pubblico per poi poterne disporre pienamente.

C. ORDINANZE SINDACALI: COERENZA TRA AREE INTERNE ED ESTERNE AL SIN

Sono attualmente in vigore diverse ordinanze sindacali, la principale del Comune di Brescia e altre di diversi comuni posti a sud del SIN, riguardanti i terreni agricoli interessati dalla contaminazione "Caffaro", che impongono limiti, divieti e prescrizioni all'utilizzo degli stessi terreni e allo svolgimento su di essi di attività agricole.

Nell'ordinanza del Comune di Brescia in particolare è presente una distinzione fra le aree agricole che ricadono all'interno del perimetro (matrice suolo) del SIN e quelle esterne al SIN, a sud della linea ferroviaria Milano-Venezia. Si constata come questa differenziazione si basa sulle indagini ambientali eseguite da ARPA nel corso degli anni (le prime risalenti al 2002, integrate poi da altre fino alle ultime condotte nel 2014/2015) e i dati, seppur mostrano un gradiente, sono molto eterogenei, pertanto si pone quantomeno la questione sull'opportunità, e forsanche sulla legittimità, alla luce delle nuove conoscenze, di mantenere questa distinzione tra le due aree.

D. RETICOLO DELLE ROGGE

Come noto il principale vettore della contaminazione "Caffaro" sono state le rogge dove per decenni è scorsa l'acqua che fuoriusciva dallo stabilimento e i cui sedimenti sono ad oggi ancora altamente contaminati e rappresentano una sorgente secondaria di contaminazione.
La messa in sicurezza delle rogge era uno degli interventi previsti nell'AdP del 2009; ad oggi non si è ancora intervenuti, è agli atti un progetto di messa in sicurezza già approvato che prevede, su alcuni tratti individuati come prioritari, interventi consistenti nella parziale rimozione dei sedimenti contaminati e nella posa di canalette in calcestruzzo per evitare che gli stessi sedimenti possano ancora essere movimentati.

Si ricorda che le rogge rientrano in una specifica, dedicata, perimetrazione del SIN per uno sviluppo complessivo di tratti interessati pari a circa 45 km. Questa perimetrazione è indipendente dalle altre (suolo e acque sotterranee) pertanto l'intero reticolo perimetrato andrebbe considerato e trattato in modo unitario; questo con specifico riferimento alla possibilità di utilizzo delle stesse rogge sia nelle aree agricole interne al SIN sia in quelle esterne. Anche in questo caso si pone infatti la questione di opportunità di mantenere asciutte le rogge interne al SIN mentre nelle aree esterne l'acqua è corrente e utilizzata per le attività agricole in deroga.

E. DECRETO MINISTERIALE SULLE AREE AGRICOLE

Come noto la normativa in tema di bonifiche presenta una lacuna per quanto riguarda le aree agricole: infatti il d.lgs 152/2006 fin dalla sua emanazione ha previsto, all'art. 241, che un regolamento specifico per le aree destinate alla produzione agricola e all'allevamento dovesse essere adottato con apposito decreto ministeriale. Purtroppo a distanza di quasi 13 anni dall'uscita del d.lgs 152/2006 questo decreto ministeriale non è ancora stato emanato sebbene ormai da qualche anno ne sia pronta una versione pressoché definitiva di cui si conoscono grosso modo anche i contenuti. Il regolamento previsto da questo decreto, pur mantenendo l'obiettivo finale di bonifica delle aree contaminate, aprirebbe la possibilità di un utilizzo agricolo delle stesse, previa verifica della salubrità dei prodotti agricoli derivanti.

L'emanazione del decreto contribuirebbe a risolvere le incongruenze tra le diverse limitazioni previste dall'ordinanza sindacale per le aree agricole interne ed esterne al SIN.

Di seguito vengono dunque descritti i diversi scenari ipotizzati.

Per consentire un migliore inquadramento della situazione e una visione complessiva di insieme si ricorda che attualmente la superficie agricola totale, pari a 64,2 ha, è così suddivisa:

- 54,8 ha di prati;
- 9,4 ha di boschi, fasce boscate.

Per un confronto economico fra i diversi scenari si prevede di stimare il costo complessivo degli interventi su un arco temporale di 60 anni (durata del periodo previsto nell'ipotesi del fitorimedio).

4.1 Opzione "0" - Nessun intervento

Questa ipotesi consiste nella cessazione delle attività di fitocontenimento portate avanti da ERSAF in questi anni e nel lasciare la situazione allo stato di fatto attuale, in cui le aree agricole interne al SIN sono soggette ai limiti più restrittivi dell'ordinanza sindacale che vieta qualsiasi forma di attività agricola.

Si ricorda come, prima dell'inizio delle attività di ERSAF nel SIN, molte di queste aree giacessero in una situazione di abbandono dovuta al fatto che molti proprietari non avevano l'interesse e la volontà di manutenere i loro terreni giacché forzatamente improduttivi; si ritiene che nel caso della cessazione dell'attività di fitocontenimento il rischio di un ritorno a condizioni di abbandono/degrado sia concreto.

Tabella 6: analisi swot per lo scenario "0"

ANALISI INTERNA	**PUNTI DI FORZA**	**PUNTI DI DEBOLEZZA**
	• *costi nulli* • *bloccato con certezza il passaggio nella catena alimentare*	• *procedimento di bonifica fermo* • *rischio di dispersione della contaminazione* • *aree che rimangono improduttive* • *incoerenza con i limiti dati dall'ordinanza per le aree più a sud*
ANALISI ESTERNA	**OPPORTUNITÀ**	**MINACCE**
	• *possibilità di ritorno all'agricoltura se dovesse essere emanato il decreto aree agricole* • *natural attenuation*	• *rischio degrado*

COSTI

In questa ipotesi i costi sono pari a 0.

4.2 Opzione "1" - Fitocontenimento

Questa opzione prevede la prosecuzione delle attività di fitocontenimento realizzate in questi anni da ERSAF. Nello specifico si tratta di continuare a svolgere le attività di trinciatura dei prati di cui all'azione A (vedi par. 2.5) e le manutenzioni delle aree oggetto di interventi forestali. La possibilità di una continuazione di queste attività andrebbe valutata considerando i benefici in termini di corretta gestione agronomica, miglioramento del paesaggio e di un piccolo ma significativo segnale di interesse del pubblico nei confronti della popolazione interessata nonché di sostegno economico.

Tabella 7: analisi swot per lo scenario "1"

ANALISI INTERNA	**PUNTI DI FORZA**	**PUNTI DI DEBOLEZZA**
	• *costi molto contenuti* • *la contaminazione rimane bloccata nei suoli* • *bloccato con certezza il passaggio nella catena alimentare* • *evita il rischio degrado / mantenimento del paesaggio*	• *procedimento di bonifica fermo* • *aree che rimangono improduttive* • *incoerenza con i limiti dati dall'ordinanza per le aree più a sud*
ANALISI ESTERNA	**OPPORTUNITÀ**	**MINACCE**
	• *possibilità di ritorno all'agricoltura se dovesse essere emanato il decreto aree agricole* • *natural attenuation*	• *nessuna*

COSTI

Il costo stimato per la corretta gestione dei cotici erbosi per tutte le aree agricole interne al SIN e per le manutenzioni delle aree oggetto di interventi forestali è pari a circa 50.000 euro/anno.

costo complessivo degli interventi: 50.000 € x 60 anni = 3.000.000 €

costo al m^2 (senza acquisto delle aree):

3.000.000 € ÷ 640.000 m^2 = 4,69 €/ m^2 (per 60 anni)

costo ipotizzato per l'acquisto delle aree: 100.000 €/ha x 64 ha = 6.400.000 €

costo al m^2 (con acquisto delle aree):

3.000.000 € + 6.400.000 € = 9.400.000 €

9.400.000 € ÷ 640.000 m^2 = 14,69 €/ m^2 (per 60 anni)

4.3 Opzione "2" - Ritorno alle attività agricole

Questo scenario prevede un ritorno alla pratica di attività agricole all'interno del SIN. Un orientamento verso questa soluzione sarebbe supportato da alcuni elementi, di seguito elencati:

- gli studi condotti da ERSAF e ATS sul passaggio dei contaminanti nei prodotti agricoli (vedi cap. 3.2) hanno dimostrato, almeno per alcune colture, che queste possono essere coltivate in sicurezza anche in presenza di alti livelli di contaminazione nel contesto del SIN Caffaro;
- verrebbe risolta un'incoerenza rispetto alle aree agricole esterne al SIN dove attualmente è possibile praticare attività agricole. Questa distinzione, alla luce degli studi condotti in questi anni e delle conoscenze acquisite, appare sempre più superata e immotivata;
- l'eventuale utilizzo di coltivazioni di specie poliennali per la produzione di biomasse potrebbe innescare una filiera produttiva alternativa alle produzioni agricole tradizionali e nel contempo ridurre i rischi conseguenti alle frequenti lavorazioni del terreno.

Tabella 8: analisi swot per lo scenario "2"

ANALISI INTERNA	**PUNTI DI FORZA**	**PUNTI DI DEBOLEZZA**
	• *ritorno alla produttività delle aree* • *redditività dei terreni* • *coerenza con i limiti dati dall'ordinanza per le aree più a sud*	• *procedimento di bonifica fermo* • *alcune colture necessitano di acqua (attualmente non disponibile nel SIN)* • *aziende agricole inattive da anni*
ANALISI ESTERNA	**OPPORTUNITÀ**	**MINACCE**
	• *coerenza con l'emanando decreto sulle aree agricole* • *devono essere definite quali attività si possono fare in sicurezza → necessità di un percorso di accompagnamento al ritorno dell'agricoltura con adeguata formazione* • *innesco di filiere innovative/verdi (biomasse)* • *natural attenuation*	• *rischio di dispersione della contaminazione se le attività non vengono eseguite correttamente (polveri, erosione)* • *deve essere verificato e monitorato il blocco del passaggio nella catena alimentare* • *si torna a utilizzare le rogge (prima dovrebbero essere messe in sicurezza?)* • *sicurezza dei lavoratori* • *anzianità agricoltori*

COSTI

Un'ipotesi di questo tipo non prevede alcun costo da parte pubblica.

4.4 Opzione "3" - Bosco

Questo scenario rappresenta una soluzione che si basa su ragionamenti di tipo sia urbanistico sia ecologico/ambientali e di visione più generale del futuro della città.

Dal punto di vista tecnico la soluzione si ritiene attuabile solo previa acquisizione delle aree da parte del pubblico. Da esperienza diretta si è infatti constatato come i proprietari dei terreni siano per la quasi totalità contrari a consentire la realizzazione di rimboschimenti sulle loro aree, non avendone in cambio alcun vantaggio ma piuttosto dei vincoli, soprattutto nel caso della creazione di veri e propri boschi ai sensi di legge.

La realizzazione di aree verdi a recupero ambientale di zone compromesse è una soluzione già praticata in contesti simili, anche e soprattutto a livello internazionale (cfr. il caso dell'Emscher Park nella zona della Ruhr in Germania). Il rimboschimento su larga scala di questa ampia porzione del territorio comunale avrebbe numerosi vantaggi soprattutto dal punto di vista ecologico e ambientale (maggiore biodiversità, immagazzinamento della CO2, raffrescamento dell'aria cittadina, corridoio ecologico, etc.).

Dal punto di vista più strettamente legato al problema della contaminazione e del procedimento di bonifica si possono fare le seguenti considerazioni:

a. l'operazione potrebbe essere considerata un intervento di messa in sicurezza permanente, adempiendo così agli obblighi previsti dal procedimento di bonifica. D'altronde un bosco è una destinazione d'uso del suolo permanente, anche dal punto di vista normativo. Un bosco è destinato a durare per un lungo periodo di tempo. Per questo motivo la scelta forestale andrebbe accompagnata dalla condivisione formale sul fatto che trattasi di messa in sicurezza permanente. Si ricorda a questo proposito che l'Accordo di Programma definiva già la realizzazione del bosco una forma di "messa in sicurezza d'emergenza", attribuendo quindi ad esso funzioni che sono proprie di un'azione di messa in sicurezza;
b. i rimboschimenti svolgerebbero una funzione di "fitocontenimento", sia a livello dell'aria, grazie alle chiome degli alberi che intercettano il particolato disperso potenzialmente contaminato, sia a livello del suolo grazie all'apparato radicale che limita grandemente i fenomeni di erosione e ruscellamento;
c. le piante, grazie all'attività evapotraspirativa, agiscono come una pompa richiamando acqua al loro interno dal suolo raggiunto dall'apparato radicale, limitando i fenomeni di saturazione idrica dei terreni e conseguente possibile lisciviazione dei contaminanti verso la falda.

Tabella 9: analisi swot per lo scenario "3"

ANALISI INTERNA	**PUNTI DI FORZA**	**PUNTI DI DEBOLEZZA**
	• *fitocontenimento* • *la contaminazione rimane bloccata nei suoli* • *vantaggi ecologico-ambientali* • *bloccato con certezza il passaggio nella catena alimentare*	• *necessità di acquisire le aree* • *non si dà corso alla bonifica*
ANALISI ESTERNA	**OPPORTUNITÀ**	**MINACCE**
	• *il procedimento di bonifica si potrebbe attuare attraverso un intervento di messa in sicurezza permanente* • *natural attenuation*	• *rischio degrado (se non affiancato da gestione pubblica)*

COSTI

Il costo stimato per la realizzazione e gestione del bosco (comprensivo dell'acquisizione delle aree), per la durata dell'intero periodo considerato (60 anni) è stato così calcolato:

AZIONE	QUINQUENNIO	CALCOLO
acquisto aree	I	100.000 €/ha x 59,7 ha = 5.970.000 €
impianto e cure colturali	I	50.000 €/ha x 57,4 ha = 2.870.000 €
diradamenti	II	10.000 €/ha x 57,4 ha = 574.000 €
diradamenti	III	10.000 €/ha x 57,4 ha = 574.000 €
diradamenti	IV - XII	100.000 €/quinquennio x 9 quinquenni = 900.000 €
TOTALE		**10.888.000 €**
Costo al m² (con acquisto delle aree) (per 60 anni)		**10.888.000 € ÷ 597.000 m² = 18,24 €/m²**
Costo al m² (senza acquisto delle aree) (per 60 anni)		**4.918.000 € ÷ 597.000 m² = 8,24 €/m²**

4.5 Opzione "4" - Bioremediation

Questa soluzione rappresenterebbe la finalizzazione e l'applicazione in campo della sperimentazione condotta da ERSAF in questi anni sullo studio di tecniche di biorimedio per i terreni agricoli del SIN Caffaro.

Per la descrizione esaustiva del processo si rimanda al documento "Protocollo operativo per la progettazione degli interventi di bonifica con tecniche di bioremediation sui terreni delle aree agricole del SIN Brescia-Caffaro", predisposto da ERSAF e consegnato contestualmente alla presente Relazione.

Il principale vantaggio dato da questa scelta è rappresentato sicuramente dal fatto che consente di dare pienamente atto a quanto previsto dal procedimento di bonifica, andando a intervenire sulla riduzione della contaminazione nel suolo fino auspicabilmente al raggiungimento degli obiettivi di bonifica.

Uno dei problemi da considerare riguarda anche in questo caso la disponibilità delle aree ovvero valutare se un intervento pubblico può essere attuato su terreni di privati o sarà necessario acquisire tali aree. Appare comunque molto difficile ipotizzare che siano i singoli privati a portare avanti questo tipo di interventi: si ricorda infatti che il protocollo di cui sopra prevede una fase di caratterizzazione del sito che deve necessariamente essere eseguita da tecnici specializzati, ma anche i successivi interventi di bonifica, consistenti per la parte più operativa nella coltivazione di essenze vegetali, dovrebbero comunque essere condotti da personale abilitato, considerando inoltre che tutto il processo sarà accompagnato da monitoraggi chimici e biologici.

Tabella 10: analisi swot per lo scenario "4"

ANALISI INTERNA	**PUNTI DI FORZA**	**PUNTI DI DEBOLEZZA**
	• *miglioramento della matrice ambientale suolo* • *si dà corso al procedimento di bonifica nella sua accezione più piena* • *riduzione dei tempi di natural attenuation*	• *tempi lunghi per la bonifica* • *definire chi fa gli interventi:* ○ *pubblico → bisogna acquisire le aree* ○ *privati → vanno pensate forme di incentivi* • *aree che rimangono improduttive* • *incoerenza con i limiti dati dall'ordinanza per le aree più a sud*
ANALISI ESTERNA	**OPPORTUNITÀ**	**MINACCE**
	• *sviluppo sul territorio di un know-how estremamente raro e specializzato*	• *l'uscita del decreto sulle aree agricole potrebbe rendere non più prioritaria la bonifica*

COSTI

Come dettagliatamente descritto nel cap. 17 del Protocollo operativo, il costo stimato per questa ipotesi di intervento è pari a 14.500.000 €, da sviluppare su una superficie di 54,9 ha. Pertanto il costo al m^2 risulta pari a:

costo al m^2 (senza acquisto delle aree):

14.500.000 € ÷ 549.000 m^2 = 26,41 €/ m^2 (per 60 anni)

costo ipotizzato per l'acquisto delle aree: 100.000 €/ha x 54,9 ha = 5.490.000 €

costo al m^2 (con acquisto delle aree):

14.500.000 € + 5.490.000 € = 19.990.000 €

19.990.000 € ÷ 549.000 m^2 = 36,41 €/ m^2 (per 60 anni)

5 Relazioni con istituzioni e cittadini

5.1 Incontri e rapporti con le istituzioni locali

A partire dall'assunzione dell'incarico, nel 2013, è stata attivata una stretta rete di rapporti con tutti i soggetti pubblici coinvolti nella problematica del SIN Caffaro. In particolare si sono tenuti incontri e riunioni con Comune di Brescia, ARPA Brescia, Associazioni agricole, Associazioni ambientaliste, residenti nelle aree agricole e proprietari delle stesse, aziende agricole del SIN. I rapporti sono stati inizialmente di diffidenza (anche con prese di posizione critiche nel mondo ambientalista sul ruolo di ERSAF, espresse ai più alti livelli) ma col tempo è sembrato che l'attività dell'ente abbia guadagnato gradualmente la fiducia delle diverse realtà, istituzionali e non, anche se rimane l'impressione generale che certe istituzioni e media locali abbiano interpretato come scarsa efficienza e/o lentezza d'azione quelli che invece sono i tempi necessari e le attenzioni indispensabili per svolgere un'attività così delicata e innovativa. La scelta del biorimedio, presa a monte dell'affidamento dell'incarico ad ERSAF è coraggiosa e realistica ma abbisogna di una consapevolezza sulle tempistiche che nell'era della rapidità stenta ad affermarsi.

5.2 Comitato scientifico ATS per la valutazione dei rischi ambientali per la salute

Dopo la fase iniziale delle attività nelle aree agricole, ERSAF è stata invitata a far parte del Comitato tecnico-scientifico per la valutazione dei rischi ambientali per la salute, istituito dall'ATS di Brescia. La partecipazione a questo importante momento di approfondimento e condivisione, ha permesso lo scambio di informazioni sulle attività in corso e la presentazione di attività in cui ERSAF è stata coinvolta unitamente all'ATS stessa, tra cui lo studio del passaggio dei contaminanti nelle produzioni agricole e il progetto dell'orto sperimentale in campo.

5.3 Tavolo tecnico Aree agricole Caffaro

A partire dall'anno 2014 il gruppo di lavoro voluto dal Comune di Brescia per la gestione dell'ordinanza sindacale, comprendente diversi soggetti pubblici oltre alle associazioni agricole, ha accolto anche ERSAF ed il coordinamento dello stesso tavolo è stato trasferito in capo all'Ufficio Territoriale Regionale di Brescia, in virtù del fatto che la contaminazione, inizialmente circoscritta al solo comune di Brescia, ha coinvolto aree ricadenti in alcuni altri

comuni dell'hinterland bresciano meridionale. Scopo del Tavolo tecnico sulle aree agricole è la regolamentazione delle attività agricole in aree soggette alle restrizioni previste dalle diverse ordinanze sindacali dei diversi Comuni coinvolti dalla contaminazione. Ai lavori del Tavolo ERSAF ha contribuito in virtù delle competenze proprie dell'Ente in materia agricola e forestale.

In particolare, ERSAF ha collaborato inizialmente con altri soggetti del tavolo alla predisposizione di una relazione mirante a sostenere la praticabilità della coltivazione del mais da trinciato in osservanza di determinati accorgimenti tecnici, nonché all'impostazione di linee guida per il campionamento e l'analisi delle parcelle sperimentali finalizzate a verificare la salubrità delle coltivazioni attuate nelle aree a rischio contaminazione.

Il 2015 è stato un anno importante per le attività del tavolo: infatti è stato l'anno in cui, a seguito dei riscontri positivi ottenuti nei controlli e campionamenti effettuati a partire dal 2014 dall'ASL di Brescia, è stato possibile liberare gli agricoltori dall'obbligo di analisi sulla granella di mais.

In stretta connessione con l'attività di cui sopra, ERSAF ha collaborato con ASL per la coltivazione di parcelle sperimentali di mais in terreni molto contaminati (vedi paragrafo 3.2).

ERSAF ha partecipato alle numerose riunioni del TTAA e ha fattivamente collaborato, in un sottogruppo di lavoro dedicato, alla stesura di un documento sulle buone pratiche in tema di irrigazione e utilizzo delle acque fluenti nelle rogge facenti parte del reticolo definito nella perimetrazione del SIN.

Nel 2016 una novità ha riguardato la possibilità di deroga ai divieti per le coltivazioni di frumento, triticale, orzo, canapa e soia. Si tratta di alcune delle essenze oggetto di sperimentazione nell'ambito del progetto Commissario-ATS-ERSAF.

In relazione alle diverse attività che vanno nella direzione di valutare la possibilità di un ritorno all'attività agricola in aree contaminate, ERSAF ha posto al tavolo l'importanza di tenere conto non solo dei dati analitici riferiti ai prodotti vegetali coltivati nelle aree contaminate, ma anche delle altre implicazioni derivanti da un ritorno a praticare attività agricole in tali aree ovvero, in particolare, il sollevamento di polveri durante le lavorazioni del terreno, l'erosione eolica ed il ruscellamento, favoriti dalla maggior percentuale di terreno nudo rispetto a una condizione di prato. Tali aspetti devono essere valutati attentamente per le ricadute in termini di esposizione potenziale, sia per gli operatori che andranno a lavorare su questi terreni, sia per la popolazione residente prossima alle aree in questione.

Nel corso del 2017 al tavolo tecnico sono stati presentati i risultati degli studi condotti da ATS Brescia, con il supporto di ERSAF per la parte di attività agricole, sul passaggio dei contaminanti nei prodotti agricoli, al fine di valutare eventuali aggiustamenti alle ordinanze sindacali in vigore per i terreni agricoli impattati dalla contaminazione "Caffaro".

Una novità ha riguardato l'esclusione della possibilità di deroga ai divieti per la coltivazione della canapa a seguito dei primi risultati pervenuti dai progetti in corso.

L'altro tema oggetto di discussione ha riguardato la sicurezza dei lavoratori agricoli che si trovano ad operare nelle aree contaminate, e per la quale l'ATS ha ritenuto necessario completare il quadro conoscitivo attraverso la raccolta di questionari e interviste.

Nel corso del 2018 vi è stato solo un incontro di saluto finale prima delle elezioni regionali, senza che poi il Tavolo fosse convocato per ulteriori riunioni.

5.4 Attività RECONnet

Nel 2015 ERSAF, con delibera n. III/131 del 26 marzo 2015, ha aderito ufficialmente a RECONnet (Rete italiana sulla gestione e la bonifica dei siti contaminati), entrando poi a far parte del Gruppo di Lavoro specifico su "Le fitotecnologie nella bonifica dei siti contaminati".

Nell'ambito delle attività organizzate da Reconnet, ERSAF ha partecipato:

- al Seminario "Evento Reconnet" organizzato nell'ambito del Remtech di Ferrara, il giorno 25 settembre 2015;
- al III Workshop nazionale "Bonifica, recupero ambientale e sviluppo del territorio: esperienze a confronto sul fitorimedio" organizzato da ISPRA il 17 - 18 marzo 2016 a Roma;
- al IV Workshop nazionale "Bonifica, recupero ambientale e sviluppo del territorio: esperienze a confronto sul fitorimedio" organizzato da Reconnet il 19 - 20 settembre 2018 nell'ambito del Remtech di Ferrara. In questo convegno ERSAF ha presentato un intervento specifico sulle attività svolte nel SIN Brescia-Caffaro.

5.5 Coinvolgimento dei gruppi e comitati ambientalisti bresciani

A seguito di una lettera dai contenuti critici inviata dal dott. Marino Ruzzenenti, storico dell'ambiente a cui si deve il merito di aver portato alla pubblica conoscenza la problematica ambientale causata dallo stabilimento Caffaro di Brescia, la Presidente di ERSAF, dott.ssa Elisabetta Parravicini, ha prontamente convocato un incontro, svoltosi presso la sede

territoriale di Brescia di Regione Lombardia in data 21 maggio 2014, a cui hanno partecipato tutti i principali esponenti delle associazioni e dei comitati ambientalisti operanti a Brescia.

Nell'incontro sono state illustrate le finalità dell'incarico assegnato ad ERSAF e le modalità con le quali l'Ente intendeva affrontare il gravoso compito assegnatogli, senza nascondere le preoccupazioni per le difficoltà per una ricerca che non aveva precedenti e che avrebbe potuto portare anche a esiti non soddisfacenti.

L'incontro, al quale hanno dato un decisivo contributo i consulenti universitari Proff. Antonio Di Guardo e Sara Borin, ha avuto unanimi apprezzamenti, sia per l'iniziativa in sé, sia per l'approccio manifestato da ERSAF, e ha contribuito decisamente a promuovere e mantenere rapporti costruttivi con le realtà locali che, come è noto, esprimono fin dal nascere della problematica Caffaro un atteggiamento complessivamente critico nei confronti dell'attività svolta dalla pubblica amministrazione.

5.6 Attività di approfondimento scientifico

5.6.1 Anno 2013

- Simone Anelli, collaboratore ERSAF al progetto, ha partecipato a un corso di approfondimento a titolo "Contaminated site remediation – Application of advanced tools to control biological processes" tenutosi a Roma nel mese di maggio 2013 presso la sede del C.N.R. nell'ambito del progetto europeo Minotaurus;
- partecipazione a Remtech presso la Fiera di Ferrara, principale evento fieristico in Italia sul tema delle bonifiche;
- partecipazione a un workshop incentrato sul biorimedio e fitorimedio organizzato dalla Provincia di Mantova, nell'ambito del progetto Life+ "Urban Bio Fito";
- partecipazione a un workshop incentrato sul fitorimedio organizzato nell'ambito del progetto Remida presso la sede provinciale di Terni dell'ARPA Umbria (partner scientifici del progetto Remida sono: ARPA Umbria, C.N.R. – IBAF e Università della Tuscia);
- infine si cita la partecipazione di ERSAF, in qualità di osservatore, in due progetti Life+ attinenti rispettivamente il tema del fitorimedio (progetto "Urban Bio Fito" per il S.I.N. "Laghi di Mantova e Polo Chimico") e il tema della bonifica di un sito contaminato da PCB (progetto "ASTER" per aree attigue al S.I.N. "Brescia-Caffaro").

5.6.2 Anno 2014

- partecipazione al convegno "SiCon 2014", tenutosi a Brescia in data 08.02.2014, nel quale ERSAF ha illustrato le attività in corso;

- partecipazione col progetto "Clean up of persistent organic pollutants and heavy metals in agricultural soils at a large scale: a sustainable integrated strategy using bioremediation and modelling tools applied to the SIN Brescia Caffaro site (SINCLEAN)" al Bando Ricerca integrata sulle biotecnologie industriali e sulla bioeconomia 2014 della Fondazione CARIPLO. ERSAF è uno dei partner del progetto, il cui capofila è UNIMI (prof.ssa Sara Borin). Gli altri partner sono UNINS (prof. Antonio Di Guardo) e UNIROMA1 (prof. Giuseppe Raspa). Il progetto non è stato finanziato;
- organizzazione in data 21.05.2014, presso la STER di Brescia, di un incontro rivolto alle associazioni ambientaliste bresciane, nel quale ERSAF, alla presenza del Direttore e della Presidente, e i suoi consulenti scientifici prof. Antonio Di Guardo e prof.ssa Sara Borin hanno illustrato le attività in corso, con l'obiettivo di rendere l'evento un importante momento di confronto;
- organizzazione in data 16.07.2014 di una giornata didattica rivolta ai circa 30 ragazzi di provenienza internazionale partecipanti alla summer school Facilis 2014 sul tema "Il ruolo dei microrganismi nella facilizzazione dei processi in biotecnologie ambientali". La summer school è stata organizzata e gestita dal dipartimento Defens di Unimi; gli studenti sono stati accompagnati al mattino in una visita dentro l'insediamento industriale Caffaro, mentre nel pomeriggio, presso la STER, hanno partecipato ad un momento di approfondimento cui hanno contribuito i consulenti scientifici di ERSAF al progetto, prof. Antonio Di Guardo e prof.ssa Sara Borin;
- partecipazione al convegno internazionale Dioxin 2014, tenutosi a Madrid la prima settimana di settembre. All'evento, fra dei più importanti convegni internazionali sul tema dei contaminanti organici persistenti, Simone Anelli e il prof. Antonio Di Guardo hanno presentato un poster intitolato "addressing spatial variability of aged pollutants in a large site contaminated by PCBs and other POPs", al fine di illustrare il progetto in corso e pubblicizzarlo nella comunità scientifica;
- partecipazione in data 25.09.2014 al convegno organizzato da CGIL Ambiente Brescia con una relazione tenuta dal dott. Paolo Nastasio dal titolo "La messa in sicurezza delle aree agricole del SIN Brescia-Caffaro";
- partecipazione, in data 14.11.2014 a Roma, all'assemblea nazionale di Reconnet (Rete Nazionale sulla gestione e la Bonifica dei Siti Contaminati) che sta istituendo uno specifico gruppo di lavoro sul fitorimedio.

5.6.3 Anno 2015

- partecipazione del collaboratore Anelli alla summer school "Acqua, alimentazione ed energia: i fondamenti nella definizione dei protocolli di biorisanamento dei suoli contaminati" organizzata nell'ambito del progetto Life "Ecoremed" dalla Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli;
- presentazione poster convegno SETAC Europe, Barcellona, maggio 2015. Di Guardo A., Raspa G., Borin S., Zanardini E., Morosini C, Armiraglio S., Sale V. M., Anelli S., Nastasio P., "Comparing spatial variabilità of PCbs, PCDDs/Fs and metals in heavily contaminated farm soil in Brescia (Italy);

- presentazione poster convegno BAGECO 13, Milano, giugno 2015: "Spatial pattern of bacterial diversity in a site with mixed and uneven contamination, and assessment of rhizoremediation potential". F. Mapelli, L. Vergani, R. Marasco, B. Chouaia, M. Fusi, A. Di Guardo, G. Raspa, E. Zanardini, C. Morosini, S. Armiraglio, S. Anelli, P. Nastasio, V.M. Sale, D. Daffonchio, S. Borin;
- presentazione poster convegno RHIZOSPHERE 4, Maastricht, giugno 2015: "Spatial pattern of bacterial diversity in a site with mixed and uneven contamination, and assessment of rhizoremediation potential". F. Mapelli, L. Vergani R. Marasco, B. Chouaia, M. Fusi, A. Di Guardo, G. Raspa, E. Zanardini, C. Morosini, S. Armiraglio, S. Anelli, P. Nastasio, V.M. Sale, D. Daffonchio, S. Borin;
- presentazione orale convegno MICROBIAL DIVERSITY 2015, Perugia, ottobre 2015: "Spatial pattern of soil bacterial diversity in a mixed and uneven polluted site, and assessment of rhizoremediation potential". F. Mapelli, L. Vergani, R. Marasco, M. Fusi, D. Daffonchio, S. Borin.

5.6.4 Anno 2016

Convegni nazionali ed internazionali

1. È stato presentato un abstract (poster) per il convegno "XXI Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology" (Portici, settembre 2016). L. Vergani, F. Mapelli, R. Marasco, B. Chouaia, A. Di Guardo, E. Zanardini, S. Armiraglio, D. Daffonchio, S. Borin. "Microbial facilitators for phytoremediation in PCB polluted soil".
2. È stato presentato un abstract (poster) per il convegno "Soil Metagenomics" (Braunschweig, Germania, dicembre 2016). F. Mapelli, L. Vergani, S. Borin. "Spatial pattern of soil microbiome in a mixed, uneven and highly polluted site, and assessment of rhizoremediation potential."
3. Partecipazione del collaboratore Anelli alla winter school "Metodi innovativi per l'analisi e la gestione dei siti degradati e/o contaminati" organizzata nell'ambito del progetto Life "Ecoremed" dalla Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli a dicembre 2016.

Pubblicazioni scientifiche

1. È stato sottomesso alla rivista scientifica Environmental Pollution il seguente lavoro. 1) Di Guardo A, Terzaghi E, Raspa G, Borin S, Mapelli F, Chouaia B, Zanardini E, Morosini C, Colombo A, Fattore E, Davoli E, Armiraglio S, Sale VM, Anelli S, Nastasio P, Differentiating current and past PCB and PCDD/F sources: the role of a large contaminated soil site in an industrialized city area.
2. È stato sottomesso e accettato per la pubblicazione sulla rivista scientifica Science of the Total Environment il seguente manoscritto. Vergani L., Mapelli F., Zanardini E., Terzaghi E., Di Guardo A., Morosini C., Raspa G., Borin S. 2016 "Phyto-rhizoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: An outlook on plant-microbe beneficial interactions". Sci Total Environ (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.218.

5.6.5 Anno 2017

Convegni nazionali ed internazionali

1. È stato presentato un abstract (poster) per il convegno SETAC Europe a Bruxelles (maggio 2017): Di Guardo A, Raspa G, Terzaghi E., Borin S, Mapelli F., Zanardini E, Morosini C, Armiraglio S, Sale V.M, Anelli S, Nastasio P. "Rhizoremediation of an historical contaminated site in Brescia (Italy): comparing the current emission of PCBs and PCDD/F to air from soil and other sources".
2. È stato presentato un abstract (poster) per il convegno SETAC Europe a Bruxelles (maggio 2017): Vitale C.M., Zati D., Di Guardo A. "Leaching of weathered Polychlorinated Byphenils (PCBs) obtained from a contaminated site: role of dissolved organic carbon and saturation conditions in a soil column experiment".
3. È stato presentato un abstract (presentazione) per il convegno SETAC Europe a Bruxelles (maggio 2017): Terzaghi E., Morselli M., Raspa G, Zanardini E, Morosini C, Borin S, Mapelli F., Armiraglio S, Sale V.M, Anelli S, Nastasio P. Di Guardo A. "Role of rhizoremediation in a complex PCB soil contamination gradient".
4. È stato presentato un abstract (presentazione) per il convegno SITE a Napoli (settembre 2017): Terzaghi E., Morselli M., Raspa G, Zanardini E, Morosini C, Borin S, Mapelli F., Armiraglio S, Sale V.M, Anelli S, Nastasio P. Di Guardo A. "Role of rhizoremediation in a complex PCB soil contamination gradient".
5. È stato presentato un abstract (presentazione) per il convegno Microbial Diversity Conference a Bari, Italia, 25 Novembre 2017: Vergani L, Mapelli F, Marasco R, Crotti E, Fusi M, Daffonchio D, Borin S. 2017. "Bacteria associated to plants naturally selected in a historical PCB polluted soil show potential to sustain natural attenuation".
6. È stato presentato un abstract (presentazione) per il convegno BioBio Conference a Praga, Repubblica Ceca, 26 Giugno 2017: Vergani L, Mapelli F, Marasco R, Crotti E, Fusi M, Daffonchio D, Borin S. 2017. "Bacteria associated to plants naturally selected in a historical PCB polluted soil show potential to sustain natural attenuation".
7. È stato presentato un abstract (poster) per il convegno BAGECO Conference ad Aberdeen, Scozia, UK, 4-8 Giugno 2017: Vergani L, Mapelli F, Marasco R, Crotti E, Fusi M, Daffonchio D, Borin S. 2017. "The rhizosphere of naturally selected plants shows the potential to sustain natural attenuation processes in an historical PCB polluted soil".

Pubblicazioni scientifiche

1. È stato pubblicato sulla rivista scientifica Environmental Pollution il seguente lavoro: Di Guardo et al., 2017 (Di Guardo, A., Terzaghi, E., Raspa, G., Borin, S., Mapelli, F., Chouaia, B., Zanardini, E., Morosini, C., Colombo, A., Fattore, E., Davoli, E., Armiraglio, S., Sale, V.M., Anelli, S., Nastasio, P., 2017. Differentiating current and past PCB and PCDD/F sources: The role of a large contaminated soil site in an industrialized city area.

5.6.5.1 Convegno organizzato da ERSAF

Il giorno 26 giugno 2017, presso il Museo di Scienze Naturali di Brescia, ERSAF ha organizzato un convegno dal titolo: "Fitocontenimento e sperimentazione di tecnologie di bioremediation nei terreni agricoli" che è stata l'occasione per fare un punto, insieme e con l'aiuto dei consulenti scientifici, di tutte le attività svolte fino a quel momento nell'ambito dell'incarico affidatoci da Regione Lombardia per l'attuazione del punto E) dell'Accordo di Programma. Si è trattato di un evento divulgativo rivolto sia ad un pubblico specializzato sia ai comuni cittadini; si è dunque cercato, nei limiti della complessità della materia, di essere il più comprensibili possibile pur mantenendo un buon livello di approfondimento scientifico.



Figura 13: sala del Museo di Scienze Naturali durante il convegno del 26 giugno.

5.6.6 Anno 2018

Convegni nazionali ed internazionali

1. È stato presentato un abstract (presentazione) per il convegno Global Symposium on Soil Pollution della FAO a Roma (maggio 2018). Simone Anelli, Alessandra Gregori, Pietro Iavazzo, Lucia Leonardi, Paolo Nastasio, Adriano Prandelli, Vanna Maria Sale, Carmelo Scarcella, Fabrizio Speziani "Transfer of contaminants from agricultural contaminated soils to crop plants: a field study at Brescia-Caffaro SIN (Italy)".
2. È stato presentato un abstract per il convegno SETAC Europe a Roma (maggio 2018). Di Guardo A., Raspa G., Terzaghi E., Borin S., Mapelli F., Zanardini E., Morosini C., Armiraglio

S., Sale V.M., Anelli S., Nastasio P.: "Vertical movement of PCBs in agricultural soils impacted by an historical contaminated site: using SoilPlus model to predict discharge, dynamics of movement in soil, and rhizoremediation potential".

3. È stato presentato un abstract per il convegno SETAC Europe a Roma (maggio 2018). Mapelli F., Vergani L., Terzaghi E., Raspa G., Zanardini E., Morosini C., Di Guardo A., Borin S.: "Soil pollution and physico-chemical properties steer the bacterial community structure in the uneven highly polluted SIN-Caffaro site".
4. È stato presentato un abstract per il convegno SETAC Europe a Roma (maggio 2018). Vergani L., Mapelli F., Terzaghi E., Raspa G., Uhlik O., Zanardini E., Morosini C., Di Guardo A., Borin S.: "Evaluation of the plant-driven biostimulation of soil microbiota for the setup of a site-tailored rhizoremediation process in a historical PCB polluted soil".
5. È stato presentato un abstract per il convegno SETAC Europe a Roma (maggio 2018). Terzaghi E., Zanardini E., Morosini C., Raspa G., Borin S., Mapelli F., Vergani L., Di Guardo A.: "Are PCB half-lives obtained in rhizoremediation experiments reliable? Pitfalls in experimental design and suggested guidelines for conducting the experiments".
6. È stato presentato un abstract per il convegno SETAC Europe a Roma (maggio 2018). Vitale C.M., Terzaghi E., Morselli M., Di Guardo A.: "Dynamic modelling of fluxes of weathered polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil: column experiments vs. modelling approaches in realistic environmental conditions".
7. È stato presentato un abstract per il convegno 7th European Bioremediation Conference & 11th ISEB Conference, Chania, Greece, 25-28 giugno 2018. Vergani L., Mapelli F., Terzaghi E., Raspa G., Ondrej U., Zanardini E., Morosini C., Di Guardo A., Borin S.: "Rhizoremediation of a historical PCB polluted soil: plant-driven biostimulation of the soil microbiome".
8. È stato presentato un abstract (presentazione) per il convegno REMTECH a Ferrara (settembre 2018): Anelli S., Iavazzo P., Prandelli A., Sale V.M., Nastasio P. "Fitocontenimento e sperimentazione di tecnologie di bioremediation nei terreni agricoli del SIN Brescia-Caffaro".
9. È stato presentato un abstract (presentazione) per il convegno World Forum on Urban Forests a Mantova (novembre 2018): Anelli S., Iavazzo P., "Methodological approach for the potential use of phytotechnologies in the remediation of agricultural soils of Brescia-Caffaro SIN (Italy)".

RINGRAZIAMENTI

Il responsabile dell'incarico (Paolo Nastasio) e gli altri estensori (Simone Anelli, Pietro Iavazzo e Vanna Maria Sale) ringraziano innanzitutto i componenti del Gruppo di Lavoro ed i collaboratori ERSAF che hanno sviluppato e realizzato in questi sei anni il progetto: Stefano Armiraglio, Sara Borin, Paolo Casciano, Elio Crescini, Antonio Di Guardo, Francesca Mapelli, Cristiana Morosini, Nunzio Pisano, Adriano Prandelli, Giuseppe Raspa, Alice Tanfoglio, Elisa Terzaghi, Stefania Tolazzi, Lorenzo Vergani, Elisabetta Zanardini.

Ma questa attività non si sarebbe potuta realizzare senza il prezioso aiuto, non importa se piccolo o grande, di tante persone che in questi anni hanno dato un contributo al nostro lavoro. Sono dirigenti e funzionari di enti e istituzioni, ricercatori, consulenti, lavoratori, ma anche proprietari e conduttori dei terreni agricoli che, con senso di responsabilità, li hanno messi a disposizione del progetto. Li elenchiamo di seguito, scusandoci anticipatamente con coloro che, involontariamente, saranno sfuggiti alla nostra memoria. A tutti loro vada la nostra riconoscenza.

Fabrizio Adani, Mauro Agosti†, Enrico Alberico, Silvana Alberti, Agostino Andreoli, Giuseppe Andreoli, Barbara Angelone, Pierino Antonioli, Severo Antonioli, Pietro Apostoli, Cecilia Ardesi, Costantino Arrighini, Stefania Balzamo, Marco Bazzoli, Eleonora Beccaloni, Marina Bellotti, Augusto Belluzzo, Cristina Benvenuti, Laura Benvenuti, Daniele Bersini, Claudio Bertella, Luigi Bertocchi, Marisa Beschi, Gaetano Bianchetti, Gottardo Bignotti, Orazio Bonassi, Rocco Bortoletto, Giancarlo Bozza, Pietro Vittorio Bozza, Stefano Brenna, Franca Brescianini, Pierino Brescianini, Maura Bressanelli, Ettore Brunelli, Alessandra Buffoli, Carla Buffoli, Giovanni Buffoli†, Lucia Buffoli, Marco Buffoli, Ornella Buffoli, Leopanzio Cannillo, Susy Canti, Enrico Capitanio, Paolo Cappellari, Angelantonio Capretti, Maurizio Carinato, Anna Carolei, Paolo Castellini, Camilla Cicerone, Sandro Cobror, Gianni Colombari†, Gianfranco Comincini, Miriam Cominelli, Daniele Comperti, Elisabetta Confalonieri, Massimiliano Confalonieri, Domenico Cortese, Eleonora Cotelli, Fausto Cottelli, Stefano Covelli, Girolamo Cozzaglio, Federico Cremonini, Roberto Cremonini, Renzo Crescini, Anna Cristoforini Carughi, Giuliano Cucchi, Laura D'Aprile, Francesca D'Avena, Marco D'Orso, Fausto Dassè, Marco Dassè, Enrico Davoli, Pierluisa Della Vedova, Nicola Di Nuzzo, Cesare Dioni, Angelo Elefanti, Elisabetta Ernani, Luigi Faccini, Dante Fasolini, Caterina Faustini, Claudio Fazzi, Claudio Ferrari, Emilia Ferrari, Enrica Ferretti, Fulgenzio Ferri, Denise Festa, Edoardo Filippini, Gianluigi Fondra,

Liberale Formentini, Maurizio Galli, Valerio Gambarini, Siria Garattini, Paolo Gardini, Mara Gasparini, Fabio Gavazzi, Enrica Gennari, Fiodor Ghenciu, Battista Ghidotti, Vincenzo Ghidotti, Roberta Ghitti, Gianpaolo Giugno, Giorgio Gorini, Anna Gosio, Alessandra Gregori, Paola Grenni, Aldo Gritti, Gianpietro Ippomei, Graziano Lazzaroni, Lucia Leonardi, Avelino Lombardi, Valentina Lorenzi, Alfredo Lorenzotti, Giuseppe Lorenzotti, Fabio Losio, Alessandra Lucentini, Giancarlo Manfredotti, Luigi Manfredotti, Paolo Martinelli, Angelo Massacci, Loredana Massi, Paola Mazzola, Lorenzo Mensi, Federico Nicola Messerklinger, Tiziana Mogavero, Andrea Monti, Roberto Moreni, Francesco Negri, Gian Paolo Oneda, Grazia Orizio, Massimo Ornaghi, Manuela Panzera, Elisabetta Parravicini, Maria Luisa Pastore, Alberto Pedrazzani, Claudio Pelizzari, Franco Pezzali, Paolo Pianta, Giancarlo Piccioni, Roberto Pilu, Giovanni Platto, Marco Preti, Marina Quadrio, Mauro Quadrio, Roberta Quadrio, Giovanni Ravanelli, Maddalena Ravelli, Gianpiero Ribolla, Enrico Ronchi†, Severo Ronchi, Daria Rossi, Filippo Rovetta, Maria Rovetta, Marino Ruzzenenti, Luca Salvadori, Giuseppe Sandrini, Ornella Savoldi, Paola Sberna, Mauro Scaglia, Gabriele Scalmana, Carmelo Scarcella, Massimo Schiavi, Marco Sciaccaluga, Giulio Sesana, Domenica Sottini, Fabrizio Speziani, Alessandro Stefani, Giuseppe Telaro, Pasquetta Titoldini, Livio Tomasoni, Emilio Trasmundi, Anna Ungari, Bianca Veronesi, Marco Volante, Giulio Zanaroli, Franca Zaniboni, Bruno Zappella, Daniela Zappella, Mafalda Zappella, Giulia Zucchi.

Si ringraziano infine le aziende che hanno gentilmente fornito a titolo gratuito materiale utilizzato durante il progetto: Agricanapa, L'Ortolano, Società Italiana Sementi, Vivai Valfredda.

Brescia, 7 febbraio 2019

TAVOLE



Legenda

- Sito Caffaro
- Confine SIN terreni
- Confine SIN falda
- Confine aree agricole
- Superfici classificate come aree agricole

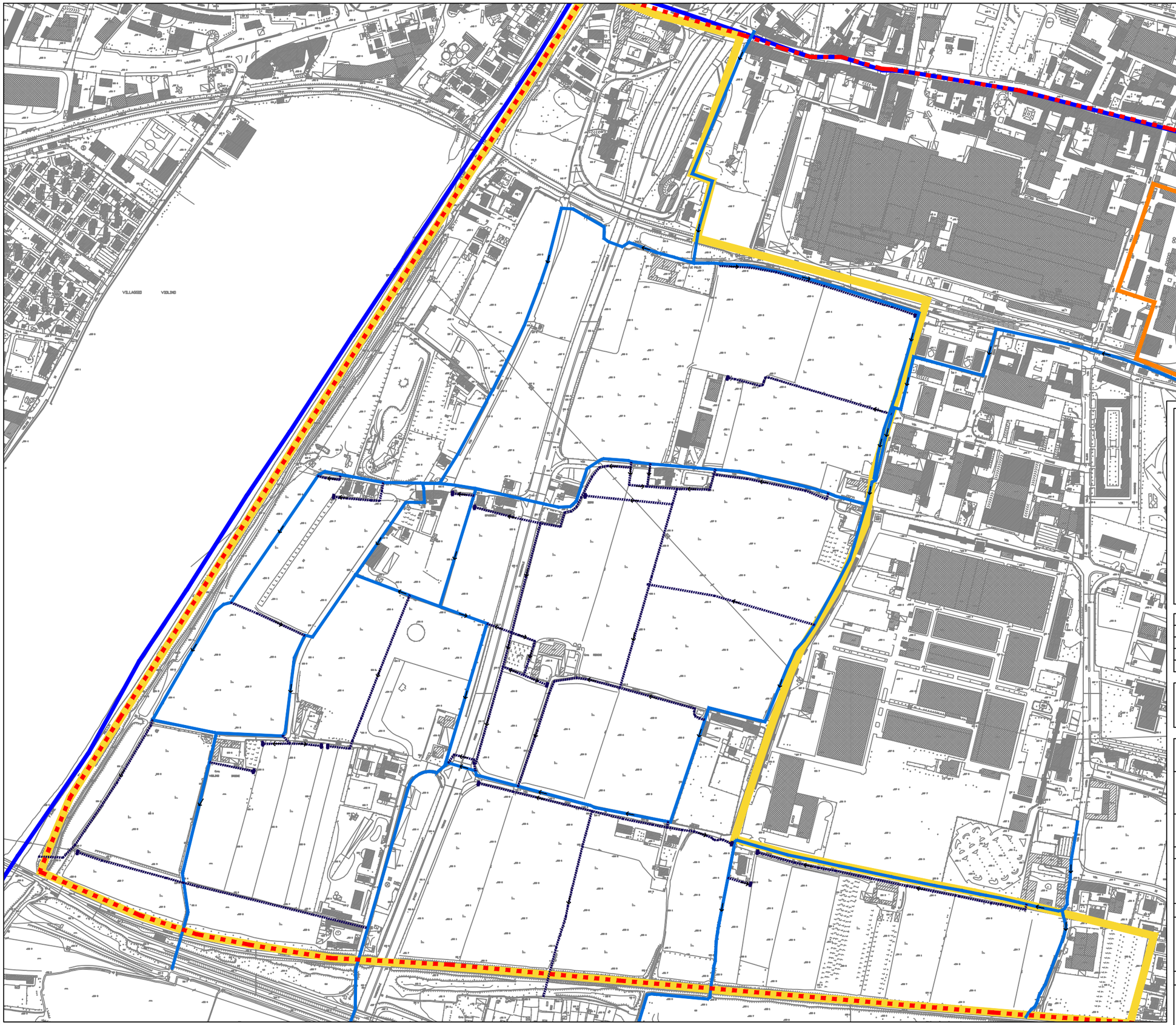
Revisione	Data	Disegnato	Verificato	Approvato
1	07/02/2019	Crescini	Anelli/Iavazzo	Nastasio
0	21/12/2018	Crescini	Anelli/Iavazzo	Nastasio

Preparato da:

ERSAF – ENTE REGIONALE PER I SERVIZI ALL'AGRICOLTURA E ALLE FORESTE
Via Pola, 12 – 20124 Milano – tel. (+039) 02.67404.1 – fax (+039) 02.67404.299
www.ersaf.lombardia.it – checklistersaf@pec.lombardia.it
P.E.C. - ersaf@pec.regione.lombardia.it
C.F./P.IVA 03093920969

Committente:	Regione Lombardia " incarico prot. T1.2013.0005485 del 14/03/2013"
Progetto:	Attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole nel SIN Brescia-Caffaro
Sito:	Aree agricole inscritte nel perimetro del Sito di Interesse Nazionale "Brescia-Caffaro"
Rif. Prg.	Prg: AdP 29/09/2009
Elaborato:	Relazione finale delle attività svolte da ERSAF nelle aree agricole del SIN Brescia-Caffaro nel periodo 2013-2018
Tavola N.	*Titolo:*
1	Individuazione delle aree agricole interne al SIN

Orientamento	*Scala*	*Formato*
N	1:5.500 0 100 200 m	A3



Legenda

- Sito Caffaro
- Confine SIN terreni
- Confine SIN falda
- Confine aree agricole
- Rogge
- Fossi adacquatori

1	07/02/2019	Crescini	Anelli/Iavazzo	Nastasio
0	21/12/2018	Crescini	Anelli/Iavazzo	Nastasio
Revisione	*Data*	*Disegnato*	*Verificato*	*Approvato*

Preparato da:

ERSAF – ENTE REGIONALE PER I SERVIZI ALL'AGRICOLTURA E ALLE FORESTE
Via Pola, 12 – 20124 Milano – tel. (+039) 02.6740.4.1 – fax (+039) 02.67404.299
www.ersaf.lombardia.it – direttoreersaf@ersaf.lombardia.it
P.E.C.: ersaf@pec.regione.lombardia.it
C.F./P.IVA 03993020969

Committente:	Regione Lombardia " incarico prot. T1.2013.0005485 del 14/03/2013"
Progetto:	Attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole nel SIN Brescia-Caffaro
Sito:	Aree agricole inscritte nel perimetro del Sito di Interesse Nazionale "Brescia-Caffaro"
Rif. Prg.	Prg: AdP 29/09/2009
Elaborato:	Relazione finale delle attività svolte da ERSAF nelle aree agricole del SIN Brescia-Caffaro nel periodo 2013-2018
Tavola N.	*Titolo:*
2	Reticolo delle rogge

Orientamento	*Scala*	*Formato*
N	1:5.000 0 100 200 m	A3

ALLEGATI

ALLEGATO 1

Tabella con l'elenco dei mappali ad attuale destinazione agricola/forestale

FOGLIO	MAPPALE	SUPERFICIE (M^2)	CONDIZIONE ATTUALE
107	16	4390	BOSCO D'IMPIANTO ANNO 1998
107	19	5630	PRATO
107	20	3300	BOSCO D'IMPIANTO ANNO 1998
107	21	2170	BOSCO D'IMPIANTO ANNO 1998
107	35	6630	PRATO
107	43	14460	PRATO
107	44	640	PRATO
107	45	120	PRATO
107	48	25040	PRATO
107	52	260	PRATO
107	54	290	PRATO
107	55	1875	PRATO
107	58	3	PRATO
107	84	10	PRATO
107	85	895	PRATO
107	87	33630	PRATO
107	90	3315	PRATO
108	1	1580	PRATO
108	15	600	PRATO
108	24	9870	PRATO
108	26	30	PRATO
108	27	150	PRATO
108	33	14470	PRATO
108	44	15390	PRATO
108	46	3540	PRATO
108	52	8830	PRATO
108	54	16855	PRATO
108	73	18875	PRATO
108	78	816	PRATO
108	81	1243	VIGNETO
108	88	66135	PRATO
109	7	1580	PRATO
109	9	570	PRATO
109	10	160	PRATO
109	35	3130	PRATO
109	44	4070	PRATO
109	45	39090	PRATO
109	47	5110	PRATO
109	57	4020	PRATO
109	76	3840	PRATO
109	86	410	AREA AGRICOLA CINTATA
109	95	1330	PRATO
109	101	1430	PRATO

109	110	1823	AREA AGRICOLA CINTATA
109	127	15622	BOSCO D'IMPIANTO ANNO 1998
109	134	1800	AREA AGRICOLA CINTATA
109	136	540	AREA AGRICOLA CINTATA
109	140	2670	AREA AGRICOLA CINTATA
109	142	660	AREA AGRICOLA CINTATA
109	156	490	PRATO
109	157	120	PRATO
109	160	3050	AREA AGRICOLA CINTATA
109	161	1140	BOSCO D'IMPIANTO ANNO 1998 E NUOVO BOSCO
109	162	4700	BOSCO D'IMPIANTO ANNO 1998
109	168	11274	PRATO
109	173	3813	PRATO
109	177	3879	PRATO
109	181	499	PRATO
109	191	6768	PRATO
109	194	4185	PRATO
109	197	3400	PRATO
109	198	12748	AREA NELLA QUALE E' STATO ASPORTATO LO STRATO DI TERRENO SUPERFICIALE
132	2	4070	PRATO
132	3	980	PRATO
132	4	6370	PRATO
132	9	27789	PRATO
132	10	6590	PRATO
132	11	2250	PRATO
132	13	4570	AREA AGRICOLA CINTATA
132	15	4670	AREA AGRICOLA CINTATA
132	33	27400	PRATO
132	34	3060	PRATO
132	35	680	PRATO
132	41	3880	PRATO
132	42	14870	PRATO
132	43	150	PRATO
132	44	290	FASCIA BOSCATA
132	45	4980	PRATO
132	54	15290	PRATO
132	95	18250	PRATO
132	102	998	PRATO
133	37	14940	BOSCO DI RECENTE FORMAZIONE AI SENSI DELLA NORMATIVA NAZIONALE PER IL QUALE E' STATO CHIESTO ALL'UTR DI BRESCIA L'INSERIMENTO NEL PERIMETRO DEL PIF DELLA PROVINCIA DI BRESCIA
133	52	3190	PRATO

133	66	8340	PRATO
133	67	2220	PRATO
133	68	4720	PRATO
133	69	7620	PRATO
133	71	1860	PRATO
133	72	1510	PRATO
133	73	4920	PRATO
133	74	2730	PRATO
133	75	9070	PRATO
133	76	5750	AREA CINTATA IN PARTE AGRICOLA E IN PARTE BOSCATA
133	80	630	PRATO
133	93	4660	PRATO
133	94	4660	PRATO
133	95	2800	PRATO
135	171	570	PRATO
135	419	4295	BOSCO DI RECENTE FORMAZIONE AI SENSI DELLA NORMATIVA NAZIONALE
135	420	5460	BOSCO DI RECENTE FORMAZIONE AI SENSI DELLA NORMATIVA NAZIONALE
SUPERFICIE TOTALE		**642045**	

ALLEGATO 2

Schede di dettaglio dei terreni delle aree A-R-T

SCHEDA AREA "A"



LEGENDA

reticolo rogge

reticolo canalette d'irrigazione

reticolo canalette d'irrigazione in disuso

direzione flusso acqua nelle rogge e nelle canalette d'irrigazione

perimetro terreni omogenei

direzione giacitura terreni

origine e direzione flusso acque di irrigazione dalle canalette d'irrigazione ai campi

Il terreno 1 è tenuto a prato stabile da circa 30 anni; in precedenza era coltivato, come il resto dei campi, a mais.

I terreni 2, 3 e 4 sono sempre stati coltivati a mais, quasi mai è stato lasciato il terreno nudo d'inverno, periodo in cui si coltivava grano o altri cereali autunno-vernini; nei campi 3 e 4 spesso durante l'inverno venivano fatte le marcite (per tutta l'estensione del terreno).

Le rotazioni vedevano alternarsi al mais la coltivazione di erba medica, trifogli o erbai di loietto.

La profondità di aratura era di circa 30 cm, non superiore.

Le bocchette di adacquamento non erano fisse ma realizzate a ogni intervento irriguo con apposite lavorazioni, intervallate a una distanza di circa 15/20 m l'una dall'altra.
Sul margine settentrionale del campo 1, quando ancora era coltivato a mais, veniva realizzata una ulteriore piccola canaletta di irrigazione per bagnare anche l'area nord orientale dello stesso campo.
Si segnala che i campi 1 e 2 assorbivano rapidamente l'acqua e poi mantenevano discretamente l'umidità del terreno (anche per 15 gg) mentre nei campi 3 e 4 (in particolare il campo 3 nella sua parte meridionale) l'acqua tendeva a scorrere in superficie senza essere tanto assorbita nel terreno.
Il tempo di adacquamento era di circa 4/5 h per il campo 3 e circa 8 h per il campo 4.

I campi venivano concimati con letame aziendale.

Si segnala inoltre che capitava che nei fossi arrivasse acqua biancastra e il residuo bianco lo si ritrovava nei terreni anche l'anno successivo; questo materiale biancastro è quasi sicuramente riconducibile agli scarichi dell'Ideal Standard (produzione sanitari).

SCHEDA AREA "R"



LEGENDA

reticolo rogge

reticolo canalette d'irrigazione

reticolo canalette d'irrigazione in disuso

direzione flusso acqua nelle rogge e nelle canalette d'irrigazione

perimetro terreni omogenei

direzione giacitura terreni

origine e direzione flusso acque di irrigazione dalle canalette d'irrigazione ai campi

I terreni dell'azienda agricola Ronchi sono stati acquistati nei primi anni '20 del novecento dal padre dei 2 fratelli che attualmente sono ancora i proprietari.

Tutti i terreni (1, 2, 3 e 4) sono sempre stati coltivati seguendo un avvicendamento tipico della pianura lombarda ovvero mais alternato a prati di erba medica, trifogli e erbai di loietto; quasi mai è stato lasciato il terreno nudo d'inverno, periodo in cui o erano presenti i prati o si coltivava grano. Occasionalmente (1 o 2 volte a memoria dell'agricoltore) durante l'inverno sono state fatte delle marcite.

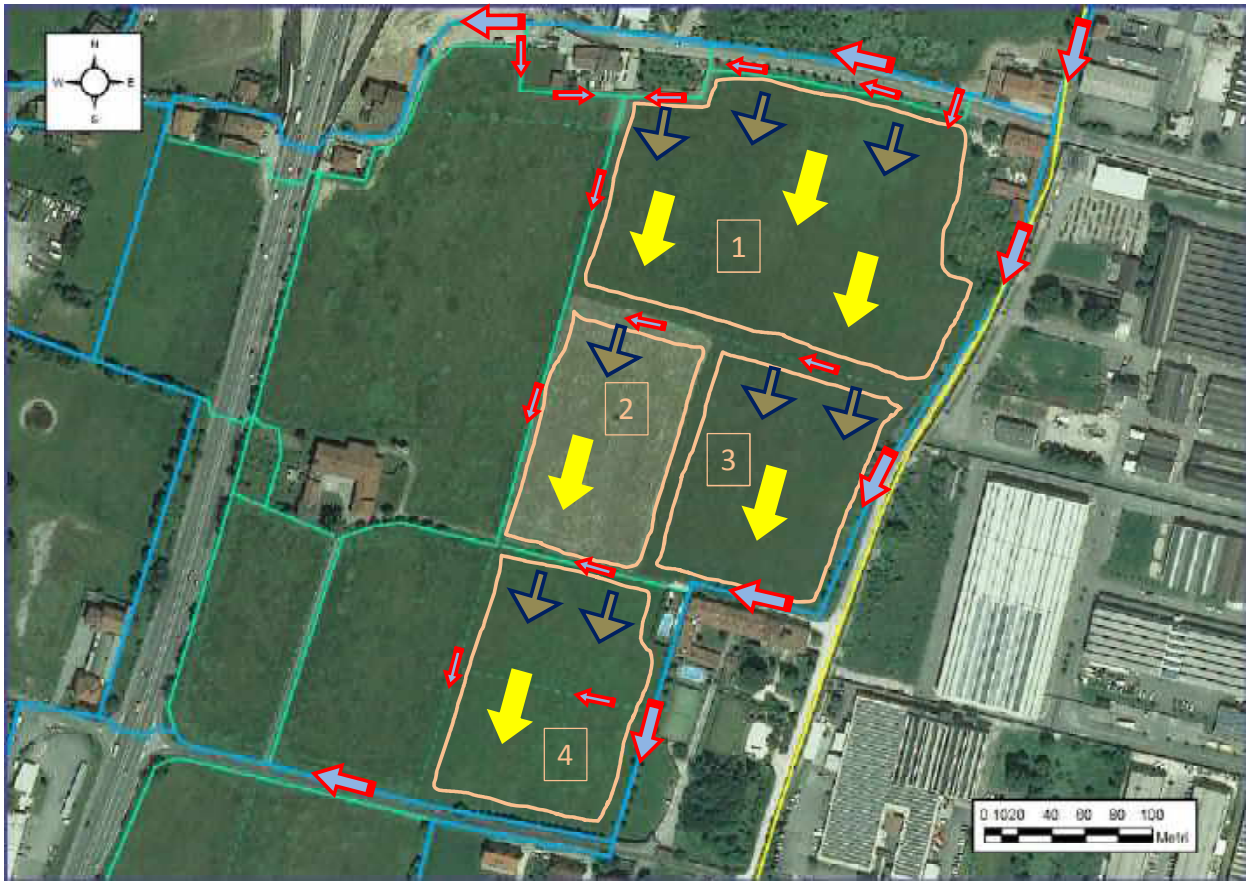
La profondità di aratura era di circa 30 cm, non superiore.

Le bocchette di adacquamento non erano fisse ma realizzate a ogni intervento irriguo con apposite lavorazioni, intervallate a una distanza di circa 5 m l'una dall'altra.
Tutti i campi avevano una discreta capacità di ritenzione idrica; non si segnalano fenomeni di ristagni di acqua.

I campi venivano concimati con letame e liquami aziendali.

Si segnala inoltre che capitava che nei fossi arrivasse acqua biancastra e il residuo bianco lo si ritrovava nei terreni anche l'anno successivo; questo materiale biancastro è sicuramente riconducibile agli scarichi dell'Ideal Standard (produzione sanitari).

SCHEDA AREA "T"



LEGENDA

reticolo rogge

reticolo canalette d'irrigazione

reticolo canalette d'irrigazione in disuso

direzione flusso acqua nelle rogge e nelle canalette d'irrigazione

perimetro terreni omogenei

direzione giacitura terreni

origine e direzione flusso acque di irrigazione dalle canalette d'irrigazione ai campi

I campi 1, 2 e 3 storicamente sono distinti dal 4 relativamente alla proprietà e conseguentemente gestiti in modo differente.

I campi 1, 2, e 3 sono stati coltivati a frumento e orzo fino al '94/'95; non è stato possibile al momento stabilire a quanto tempo indietro può risalire questa gestione. Dal '95/'96 i terreni sono stati coltivati a mais, fino al divieto di coltivazione dato con l'ordinanza del 2002.

I campi 1, 2 e 3 sono stati oggetto nel '95/'96, con il subentro di un nuovo conduttore, di un'operazione di livellamento in direzione est-ovest ovvero è stato livellato un dislivello che vedeva la parte orientale della proprietà, a ridosso con via del Rampino, essere circa 1,7 m (secondo testimonianza, da verificare) più alta rispetto alla parte occidentale, a ridosso del fosso che segna il confine con la proprietà Ronchi.
Resta ferma la direzione di scorrimento nord-sud dell'acqua utilizzata per irrigare i suddetti campi, che avevano comunque una pendenza da nord a sud (oltre al dislivello in senso longitudinale).
La canaletta di irrigazione che divide il campo 1 dai campi 2 e 3 è stata cancellata con le operazioni di livellamento del '95/'96. Ad ogni modo con la gestione precedente al '94/'95 i campi 1, 2 e 3 venivano irrigati solo saltuariamente.
Il campo 4 in passato, presumibilmente fino agli anni '60, presentava un dosso nella sua parte centrale; fino ad allora esisteva la canaletta di irrigazione che lo divide trasversalmente e che veniva utilizzata per irrigare quel campo sia verso nord sia verso sud. Successivamente la parte nord del campo è stata rialzata utilizzando terreno proveniente dagli scavi per la costruzione dei tre condomini che si trovano a sud dello stesso campo, al di là di via Rose di Sotto.

La profondità di aratura si presume essere, analogamente alle aree circostanti, di circa 30 cm, non superiore.

Si presume pure, analogamente alle aree circostanti, che le bocchette di adacquamento non erano fisse ma realizzate a ogni intervento irriguo con apposite lavorazioni.

Essendo noto il percorso delle rogge si può asserire inoltre che anche nei fossi utilizzati per irrigare questi campi arrivasse l'acqua, biancastra, riconducibile agli scarichi dell'Ideal Standard (produzione sanitari).

Si segnala che nel campo 2 è presente un capanno di caccia, presumibilmente da quando sono state interdette le coltivazioni (2002) o forse anche da più tempo; per questo motivo il campo 2, a differenza degli altri, negli ultimi anni è stato regolarmente e frequentemente sfalciato.

ALLEGATO 3

Relazione speciazione Arsenico

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA
DIPARTIMENTO DI CHIMICA E CHIMICA INDUSTRIALE
Via Dodecaneso, 31 – 16146 GENOVA
Tel. +39 0103536113 - Fax +39 0103538733

Determinazione della speciazione di arsenico in campioni di suolo secondo la procedura McLaren/Shiowatana

Report

1. Breve descrizione della procedura analitica

I campioni di sedimento sono stati essiccati in stufa e omogenizzati. Quindi, circa 1 g di ciascun campione è stato pesato su bilancia analitica e sottoposto alle seguenti estrazioni sequenziali:

Step 1 (Frazione estraibile in acqua: As solubile)
Il campione è stato sospeso in 30 mL di acqua ultrapura in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 2 (Frazione estraibile in sodio bicarbonato: As adsorbito)
Il residuo del precedente step è stato lavato con 30 mL di acqua e centrifugato, scartando il surnatante. Quindi, il residuo viene risospeso in 30 mL di $NaHCO_3$ 0.5 M in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 3 (Frazione estraibile in sodio idrossido: As associato a Fe e Al)
Il residuo del precedente step è stato lavato con 30 mL di acqua e centrifugato, scartando il surnatante. Quindi, il residuo viene risospeso in 30 mL di NaOH 0.1 M in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 4 (Frazione estraibile in acido cloridrico: As associato ai carbonati)
Il residuo del precedente step è stato lavato con 30 mL di acqua e centrifugato, scartando il surnatante. Quindi, il residuo viene risospeso in 30 mL di HCl 1 M in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 5 (Frazione residua)
Il residuo del precedente step è stato essiccato in forno. Quindi un'aliquota omogenea (circa 0.2 g) è stata pesata su bilancia analitica e solubilizzata con 4 mL di HNO_3 e 2 mL di HF, in un mineralizzatore a microonde. L'eccesso di HF è stato complessato aggiungendo 14 mL di una

soluzione satura di H_3BO_3 ed effettuando un opportuno programma termico. La soluzione risultante è stata conservata a +4°C per l'analisi.

Per ogni procedura è stato preparato un campione di bianco.

Infine, le soluzioni sono state analizzate mediante Spettrometria di emissione atomica con sorgente a plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES). Le misure sono state effettuate a 4 lunghezze d'onda specifiche per l'arsenico (188.980 nm, 193.696 nm, 197.198 nm, 228.812 nm), ottenendo dati concordi tra loro. L'effetto matrice è stato compensato mediante standardizzazione interna, impiegando la riga Lu 291.139 nm come riferimento.

Per nostro controllo interno, abbiamo inoltre trattato un'aliquota di campione mediante solubilizzazione assistita da microonde (medesime condizioni dello step 5) e confrontato il dato ottenuto con la somma dei risultati relativi ai 5 steps, ottenendo un accordo entro il 10%.

2. Risultati

Campione		**Concentrazione As (µg/g)**				
n	**codice**	**Step 1**	**Step 2**	**Step 3**	**Step 4**	**Step 5**
1	HM7	1.6	8.9	19.5	20.0	25.0
2	3A1	2.9	9.4	19.6	18.3	21.5
3	ES4	2.7	9.3	18.9	17.7	27.4
4	7B4	1.8	11.7	17.3	15.3	19.7
5	FF8	2.1	8.8	18.2	15.9	22.4
6	T3L	1.8	10.0	20.7	16.7	23.8
7	AB8	2.6	8.7	17.9	18.8	21.8

3. Riferimenti

1. Shiowatana, J., McLaren, R. G., Chanmekha, N., Samphao, A. Fractionation of Arsenic in Soil by a Continuous-Flow Sequential Extraction Method. Journal of Environmental Quality 30 (2001) 1940-1949.

2. Wan, Xiang, Dong, Haochen, Feng, Liu, Lin, Zhijia, Luo, Qiuchen. Comparison of three sequential extraction procedures for arsenic fractionation in highly polluted sites. Chemosphere 178 (2017) 402-410.

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA
DIPARTIMENTO DI CHIMICA E CHIMICA INDUSTRIALE
Via Dodecaneso, 31 – 16146 GENOVA
Tel. +39 0103536113 - Fax +39 0103538733

Determinazione della speciazione di arsenico in campioni di suolo secondo la procedura McLaren/Shiowatana

Report

1. Breve descrizione della procedura analitica

I campioni di sedimento sono stati essiccati in stufa e omogenizzati. Quindi, circa 1 g di ciascun campione è stato pesato su bilancia analitica e sottoposto alle seguenti estrazioni sequenziali:

Step 1 (Frazione estraibile in acqua: As solubile)
Il campione è stato sospeso in 30 mL di acqua ultrapura in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 2 (Frazione estraibile in sodio bicarbonato: As adsorbito)
Il residuo del precedente step è stato lavato con 30 mL di acqua e centrifugato, scartando il surnatante. Quindi, il residuo viene risospeso in 30 mL di $NaHCO_3$ 0.5 M in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 3 (Frazione estraibile in sodio idrossido: As associato a Fe e Al)
Il residuo del precedente step è stato lavato con 30 mL di acqua e centrifugato, scartando il surnatante. Quindi, il residuo viene risospeso in 30 mL di NaOH 0.1 M in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 4 (Frazione estraibile in acido cloridrico: As associato ai carbonati)
Il residuo del precedente step è stato lavato con 30 mL di acqua e centrifugato, scartando il surnatante. Quindi, il residuo viene risospeso in 30 mL di HCl 1 M in provette da centrifuga in PP e posto in agitazione per 16 ore. Quindi, la sospensione è stata centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti e il surnatante prelevato e conservato a +4°C per l'analisi.

Step 5 (Frazione residua)
Il residuo del precedente step è stato essiccato in forno. Quindi un'aliquota omogenea (circa 0.2 g) è stata pesata su bilancia analitica e solubilizzata con 4 mL di HNO_3 e 2 mL di HF, in un mineralizzatore a microonde. L'eccesso di HF è stato complessato aggiungendo 14 mL di una

soluzione satura di H_3BO_3 ed effettuando un opportuno programma termico. La soluzione risultante è stata conservata a +4°C per l'analisi.

Per ogni procedura è stato preparato un campione di bianco.

Infine, le soluzioni sono state analizzate mediante Spettrometria di emissione atomica con sorgente a plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES). Le misure sono state effettuate a 4 lunghezze d'onda specifiche per l'arsenico (188.980 nm, 193.696 nm, 197.198 nm, 228.812 nm), ottenendo dati concordi tra loro. L'effetto matrice è stato compensato mediante standardizzazione interna, impiegando la riga Lu 291.139 nm come riferimento.

2. Risultati

Campione		**Concentrazione As (µg/g)**				
n	**codice**	**Step 1**	**Step 2**	**Step 3**	**Step 4**	**Step 5**
1	As-01	1.0	5.8	12.5	10.9	25.5
2	As-02	1.9	5.9	13.2	11.4	29.2
3	As-03	0.7	4.0	10.9	7.2	35.6
4	As-04	0.9	7.2	18.6	17.6	38.0
5	As-05	3.1	10.6	20.9	19.9	32.1
6	As-06	0.3	1.6	4.7	2.9	20.2
7	As-07	0.7	3.7	9.2	8.0	27.7
8	As-08	0.7	8.2	25.1	18.7	51.3
9	As-09	1.7	9.8	25.8	21.5	42.0
10	As-10	6.1	32.1	70.9	68.8	76.9
11	As-11	0.5	2.8	7.8	5.5	27.6
12	As-12	0.9	10.2	26.2	22.6	54.4
13	As-13	0.6	6.4	17.4	11.5	47.1

3. Riferimenti

1. Shiowatana, J., McLaren, R. G., Chanmekha, N., Samphao, A. Fractionation of Arsenic in Soil by a Continuous-Flow Sequential Extraction Method. Journal of Environmental Quality 30 (2001) 1940-1949.

2. Wan, Xiang, Dong, Haochen, Feng, Liu, Lin, Zhijia, Luo, Qiuchen. Comparison of three sequential extraction procedures for arsenic fractionation in highly polluted sites. Chemosphere 178 (2017) 402-410.

ALLEGATO 4

Relazione speciazione Mercurio

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI TRIESTE

dipartimento
di matematica
e geoscienze

Dipartimento di Matematica e Geoscienze (DMG)
Università di Trieste

Committente:

ERSAF
Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste
Regione Lombardia
Via Francesco Baracca, 33 - 25128 BRESCIA

Analisi geochimica della speciazione del mercurio in campioni di suolo

Prot. DMG N° 579 III/19.9 dd. 22/06/2017
e N°2017 III/19.1 dd. 11/01/2018

Relazione Tecnica

Trieste - Marzo 2018

Il gruppo di lavoro “MercuRILab del DMG:

prof. Stefano Covelli (resp. scientifico) 

dott.ssa Elisa Petranich

Dipartimento di Matematica e Geoscienze (DMG)
Università degli Studi di Trieste
Comprensorio San Giovanni
Via Weiss 2
34128 Trieste
tel. +39 040 558 2031 – fax. +39 040 558 2048
E-mail : covelli@units.it

INDICE

1. INTRODUZIONE 1

1.1 Premessa alle analisi 1

1.2 Piano delle indagini 1

2. ATTIVITÀ DI LABORATORIO 3

2.1 Preparazione dei campioni di suolo 3

2.2 Analisi del contenuto totale di mercurio nei suoli 4

2.3 Analisi speciativa del mercurio 5

2.3.1 Spettrofotometria a fluorescenza atomica (CV-AFS) 7

3. RISULTATI 9

3.1 Concentrazioni totali di mercurio nei campioni di suolo 9

3.2 Speciazione del mercurio nei campioni di suolo 10

4 CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SUI RISULTATI 14

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI 17

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa alle analisi

L'ERSAF, l'Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste della Regione Lombardia è interessata a un'indagine speciativa del mercurio in matrici di suolo contaminato dal metallo.

In relazione a tali esigenze, il Dipartimento di Matematica e Geoscienze (DMG) dell'Università di Trieste ha proposto e portato a compimento un'analisi preliminare, denominata *Estrazione Sequenziale Selettiva,* per verificare la speciazione del metallo ovvero le forme chimiche del metallo verosimilmente presenti in campioni di suolo. Il DMG, infatti, e nello specifico il gruppo di ricerca denominato MercuRILab, è impegnato nello svolgimento di attività di studio, ricerca e controllo sui processi biogeochimici inerenti al mercurio che caratterizzano l'ambiente acquatico e terrestre e nella realizzazione, anche in collaborazione con altri organismi ed istituti operanti nel settore, di iniziative di ricerca applicata sulla contaminazione da mercurio a tutela dell'ambiente e degli ecosistemi.

1.2 Piano delle indagini

Sono stati oggetto delle analisi 20 campioni di suolo forniti al MercurRILab direttamente al committente in sacchetti di plastica. I campioni sono stati ricevuti dal suddetto laboratorio in due mandate: la prima avvenuta tra Luglio e Agosto 2017 e comprensiva di 7 campioni, la seconda invece, è avvenuta a Gennaio 2018 e ne includeva 13. Il committente dichiara che i due gruppi di campioni si distinguono essenzialmente per la fase di pretrattamento che ha coinvolto solamente i primi 7 campioni. Questi ultimi, infatti, sono aliquote derivanti dallo stesso campione di suolo, costituito da un unico cumulo di terra di circa 1,5 mc ottenuto scavando i primi 40 cm di un terreno agricolo all'interno del SIN "Brescia-Caffaro", e sottoposte a trattamento con ammendanti prime di essere pervenute al MercurRILab.

Questo cumulo è stato poi miscelato e omogeneizzato con grande accuratezza e la terra è stata utilizzata per riempire circa 200 vasi utilizzati per una sperimentazione di tecniche di biorimedio, che si è svolta nell'arco di 2 anni (2015 e 2016), durante la quale sono stati effettuati diversi campionamenti: all'inizio, durante e alla fine della sperimentazione.

In particolare, i 7 campioni analizzati si possono così specificare:

AB8 = campionato al T0, all'inizio della sperimentazione, rappresentativo dunque del cumulo iniziale;

T3L = campionato al T4, al termine dei 2 anni di sperimentazione, relativo alla tesi che ha visto in quel vaso la coltivazione di Festuca arundinacea;

7B4 = campionato al T4, al termine dei 2 anni di sperimentazione, relativo alla tesi che ha visto in quel vaso la coltivazione di Festuca arundinacea sottoposta a cicli redox (per diversi mesi nei 2 anni il vaso è stato sottoposto a cicli di sommersione della durata di 1/2 settimane alternati ad altrettanti intervalli asciutti);

HM7 = campionato al T4, al termine dei 2 anni di sperimentazione, relativo alla tesi che ha visto in quel vaso la coltivazione di Medicago sativa;

3A1 = campionato al T4, al termine dei 2 anni di sperimentazione, relativo alla tesi che ha visto in quel vaso la coltivazione di Athyrium filix-femina in consociazione con Salix caprea;

ES4 = campionato al T4, al termine dei 2 anni di sperimentazione, relativo alla tesi che ha visto in quel vaso la coltivazione di Brassica juncea;

FF8 = campionato al T4, al termine dei 2 anni di sperimentazione, relativo alla tesi che ha visto in quel vaso la coltivazione di Brassica juncea con l'aggiunta di tiosolfato d'ammonio.

Il secondo gruppo, invece, rappresenta 13 campioni di suolo superficiale tal quale, quindi non pretrattati, prelevati in altrettanti siti all'interno dell'area indagata.

Il laboratorio dell'Università di Trieste ha effettuato le indagini concordate tra le parti contraenti ed articolate nelle seguenti attività:

- Analisi del contenuto totale di mercurio previa combustione, amalgama, desorbimento termico e determinazione via spettroscopia di emissione atomica (Direct Mercury Analyzer, DMA-80) sui campioni di suolo forniti dall'ERSAF.
- Analisi speciativa del mercurio, tramite *Estrazione Sequenziale Selettiva* conosciuto come "metodo di Bloom" (da Bloom et al., 2003), su un'aliquota di campione di suolo ritenuta significativa.

Nei successivi Capitoli verranno descritti le metodologie impiegate, presentati e discussi i risultati analitici ottenuti.

2. ATTIVITÀ DI LABORATORIO

2.1 Preparazione dei campioni di suolo

I campioni di suolo sono stati lasciati ad asciugare all'aria su carta assorbente per tre giorni prima di procedere con la preparazione all'analisi (Fig. 1).

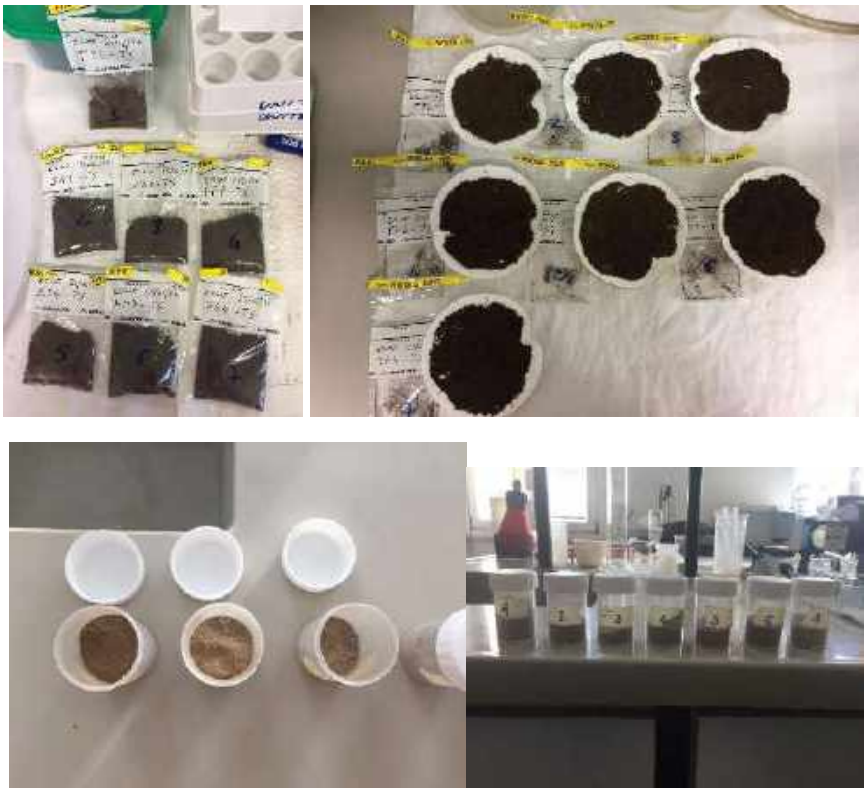


Figura 1 - Essicazione a temperatura ambiente dei suoli e particolare dei campioni macinati in mulino.

Sono stati successivamente macinati con l'ausilio di un mulino elettrico modello Retsch RS 100 (Fig. 2), dotato di due componenti cilindriche concentriche in tungsteno tra le quali viene posizionato il campione che, mediante i moti oscillatori delle componenti di cui sopra, consentono per sfregamento di ridurre il campione in polvere omogenea con dimensioni < 20 μm.

I campioni macinati sono stati quindi posti in deumidificatori singoli per eliminare l'umidità residua e, allo stesso tempo, impedire che ne assorbano dell'altra fino al momento delle analisi.



Figura 2 - Mulino Retsch RS 100 per la macinazione dei campioni di suolo o roccia (sopra) e particolare di un campione di minerale di cinabro polverizzato.

2.2 Analisi del contenuto totale di mercurio nei suoli

L'analizzatore automatico di mercurio Milestone DMA-80 permette di velocizzare le procedure di analisi, eliminando la fase di preparazione del campione. Infatti, è possibile eseguire l'analisi direttamente sul campione tal quale, per una vasta gamma di matrici (suoli, sedimenti, piante, tessuti animali, sangue, ecc.) senza bisogno di mineralizzare il sedimento.

Lo strumento opera in pieno accordo con il metodo US-EPA 7473 e combina diverse tecniche analitiche in modo automatizzato: la decomposizione termica del campione, la conversione catalitica e riduzione a Hg^0 delle specie presenti, la formazione dell'amalgama e il rilascio del Hg dalla trappola in oro con la lettura della concentrazione in spettrofotometria ad assorbimento atomico.

Il DMA-80 possiede uno spettrofotometro a doppia cella la cui sensibilità è compresa tra 0,005 e 1200 ng di Hg. È dunque possibile analizzare campioni solidi in cui la concentrazione di Hg varia dall'ordine dei ppb fino ai ppm, senza alcuna necessità di diluizione.

Le analisi sono state eseguite in triplice replica in modo da minimizzare l'errore standard percentuale che è risultato, per il primo set di campioni, sempre < 3% tranne in un caso (6%) (Tab. 2), mentre < 7% per la maggior parte dei campioni del secondo set (Tab. 3).

L'accuratezza del metodo è stata verificata analizzando un materiale di riferimento certificato (PACS-3 Marine Sediment, NRC Canada 2,98 ± 0,36 mg/kg Hg).

2.3 Analisi speciativa del mercurio

Allo scopo di valutare la potenziale mobilità e biodisponibilità del Hg dai diversi composti in cui può essere presente in suoli/sedimenti, è possibile sottoporre i campioni ad una specifica procedura analitica che consiste in una sequenza di attacchi effettuati sul campione solido mediante reattivi specifici. La procedura, detta di Estrazione Sequenziale Selettiva (ESS), permette di ottenere una serie di estratti il cui contenuto in Hg è associabile alle specie chimiche in cui il metallo è presente nel sedimento, classificate in base alla loro diversa solubilità nel mezzo estraente. Ognuna delle classi sarà quindi formata da più specie di Hg che hanno una simile capacità di mobilizzarsi dalla fase solida a quella disciolta.

Lo schema adottato per l'estrazione sequenziale è basato sulla procedura proposta da Bloom et al. (2003). A circa 400 mg di campione secco, finemente macinato e pesato in beute in pirex sono aggiunti 40 mL della prima soluzione estraente (F1). In Tabella 1 sono indicati gli estraenti e le relative specie estratte, raggruppate in base alla loro solubilità nell'estraente.

Una volta aggiunto l'estraente, i campioni nelle beute sono poste in agitazione per 18±4 ore sotto cappa a temperatura ambiente su di una piastra magnetica (Fig. 3).



Figura 3 - Beute con i campioni di suolo posti in agitazione su stirrer magnetico con soluzione estraente.

Al termine del periodo, i campioni con la soluzione (fase solida più fase acquosa) sono stati trasferiti nelle vials (Fig. 4) e centrifugati a 3000 giri/minuto per 20 minuti, allo scopo di separare la frazione solida da quella liquida. Questa operazione viene ripetuta per ciascuno dei 5 estraenti utilizzati. La fase liquida estratta, filtrata su microfiltri a 0,45 µm (Millipore Millex HA) mediante siringhe in polietilene, è versata in matracci di vetro pretrattati. La filtrazione non viene effettuata per le ultime due frazioni (Hg-e, Hg-s), poiché l'elevata acidità degli estraenti usati discioglie i microfiltri in cellulosa.

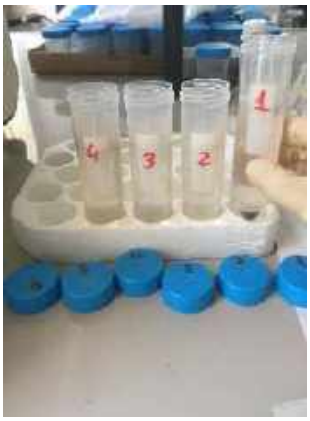


Figura 4 - Separazione della fase liquida da quella solida post centrifugazione.

***Tabella 1** - Schema operativo usato nell'estrazione sequenziale selettiva*

Frazione	**Tipologia frazione**	**Specie estratte**	**Estraente**
F1	Solubile in acqua	$HgCl_2$, $HgSO_4$	acqua deionizzata
F2	Solubile in "acidi gastrici umani"	HgO	CH_3COOH+HCl
F3	Complessi organici	Hg legato ad acidi umici, Hg_2Cl_2	KOH
F4	Complessi forti	Hg(0), Hg(II),	HNO_3
F5	Cinabro	α-HgS, β-HgS, HgSe, HgAu	*aqua regia*

Il campione è, quindi, risospeso e nuovamente centrifugato. Tutte le soluzioni ottenute da ciascuna fase, eccetto quelle provenienti dalla F5, sono state ossidate con il cloruro di bromo, BrCl (500 µL per F1, F2 e F4 e 5 mL per F3), utilizzato per convertire tutte le specie del Hg presenti in soluzione a Hg^{2+}, e portate ad un volume finale di 100 mL nei matracci. Questi sono stati chiusi con il tappo, sigillati con il parafilm e conservati al buio a 4°C fino al momento delle analisi.

Il primo step (F1) prevede come soluzione estraente l'acqua grado reagente (Milli-Q, 18,2Ω), che porta in soluzione le specie mercurifere maggiormente labili e solubili in acqua ($HgCl_2$ e $HgSO_4$). Estratta la fase F1, al suolo rimasto sul fondo delle vials è stata aggiunta la seconda soluzione estraente (F2), l'acido acetico (CH_3COOH (0,1M) + HCl (0,01M)), che simula il comportamento degli acidi gastrici dello stomaco portando in soluzione specie solubili come HgO. Dopo l'aggiunta del secondo estraente (F2), il contenuto delle vials è stato trasferito nelle stesse beute, messe poi in agitazione per altre 18±4 ore.

Il medesimo procedimento è stato eseguito per le fasi F3, F4 e F5, che prevedono l'aggiunta rispettivamente di soluzioni estraenti più forti:

- F3: KOH (1M) al fine di portare in soluzione il Hg complessato dalla sostanza organica (Hg legato agli acidi umici, Hg_2Cl_2), alla quale sono stati poi aggiunti, in fase finale, 5 mL di BrCl data la forte basicità della soluzione,
- F4: HNO_3 (12M) per il Hg elementare Hg(0) ed eventualmente presente come Hg(II) in composti organici amorfi con zolfo ed associato ad ossidi di Ferro e Manganese, ossidando poi le aliquote con 500 µL di BrCl,
- F5: *aqua regia* (HNO_3 : HCl = 1 : 3) per la componente cinabrifera (HgS), alla quale, in fase finale, non è stato aggiunto il BrCl.

Gli estratti F1 e F2 rappresentano le frazioni più mobili e, quindi, più facilmente scambiabili dal suolo. La mobilità è tendenzialmente decrescente per le componenti F3, F4 e F5: quest'ultima frazione rappresenta il Hg legato ai solfuri, principalmente cinabro e metacinabro, composti poco solubili e quindi più stabili nella fase solida.

2.3.1 Spettrofotometria a fluorescenza atomica (CV-AFS)

Il vantaggio di questa tecnica rispetto alla spettrofotometria di assorbimento atomico risiede nella sua maggior sensibilità che consente di abbassare notevolmente (dai ppb ai ppt) il limite di rilevabilità per il Hg.

Il Hg totale in ogni estratto è stato determinato dopo l'ossidazione del campione con cloruro di bromo (BrCl; 0,5 mL/100 mL campione), effettuata almeno 12 ore prima dell'analisi per

convertire tutte le specie del Hg presenti in soluzione a Hg^{2+}. In fase di analisi, il campione è stato inizialmente trattato con idrossilammina ($NH_2OH \cdot HCl$; 0,25 mL 30%) per rimuovere gli alogenuri in eccesso e, in seguito, si è proceduto con la riduzione a Hg^0 utilizzando cloruro stannoso ($SnCl_2$) come agente riducente, facendo gorgogliare il campione in un *bubbler* sotto flusso di azoto. Il Hg^0 che si sviluppa viene preconcentrato su di una trappola in oro, dove forma un amalgama che lo intrappola stabilmente. L'ultima fase dell'analisi prevede il desorbimento termico del Hg^0 che si ottiene riscaldando la trappola in oro a circa 800°C in flusso di Ar e la lettura mediante spettrofotometria atomica di fluorescenza (CV-AFS) con il Mercur (Analytic Jena, Fig. 5).



Figura 5 - Analisi delle soluzioni estratte mediante spettrofotometria atomica di fluorescenza (CV-AFS).

3. RISULTATI

3.1 Concentrazioni totali di mercurio nei campioni di suolo

Le concentrazioni del Hg totale nei 20 campioni di suolo sono riportate nelle due tabelle sottostanti (Tab. 2 e 3), ciascuna rappresentativa del primo e del secondo set di campioni, rispettivamente .

Le concentrazioni del Hg totale per i primi 7 campioni di suoloi (Tab. 2) sono comprese tra un minimo di 4,12 ed un massimo di 13,84 mg/kg. La determinazione della concentrazione di Hg totale nel CRM, Certificate Reference Material (PACS-3, NRC Canada), rientra nell'intervallo indicato (2,98 ± 0,36 mg/kg) con un errore relativo percentuale inferiore all'1%.

Tabella 2 *– Risultati analitici ottenuti con il DMA-80*

Sigla	Hg [mg/kg]	SD	RSD
T3L	11,07	0,64	6%
3A1	11,32	0,14	1%
AB8	13,84	0,12	1%
FF8	4,12	0,07	2%
ES4	11,52	0,12	1%
HM7	11,24	0,27	2%
7B4	9,38	0,32	3%
PACS-3	2,89	0,04	1%

Le concentrazioni del Hg totale del secondo set di campioni (Tab. 3), invece, presentano una maggior variabilità compresa fra 0,33 e 18,8 mg/kg. La determinazione della concentrazione di Hg totale nel CRM rientra nell'intervallo sopraindicato, con un errore relativo percentuale del 3%.

Tabella 3 *– Risultati analitici ottenuti con il DMA-80*

Suolo	Hg [mg/kg]	SD	RSD
Sample_1	1,18	0,09	7%
Sample_2	2,08	0,00	0%
Sample_3	1,76	0,04	2%
Sample_4	3,84	0,08	2%
Sample_5	7,32	0,36	5%
Sample_6	0,33	0,08	24%
Sample_7	3,31	0,10	3%
Sample_8	1,99	0,35	18%
Sample_9	7,24	0,04	1%
Sample_10	18,8	0,19	1%
Sample_11	1,21	0,12	10%
Sample_12	4,24	0,06	1%
Sample_13	1,93	0,02	1%
PACS-3	2,70	0,09	3%

3.2 Speciazione del mercurio nei campioni di suolo

Allo scopo di valutare l'efficacia del metodo di estrazione, sono stati calcolati i recuperi percentuali dell'estrazione sequenziale, ossia quanto Hg è stato estratto dall'analisi speciativa rispetto al dato totale ottenuto per analisi diretta al DMA-80. Il recupero percentuale medio è risultato essere del 74% per il primo set di campioni e del 89% per il secondo, da considerarsi un buon risultato in accordo con quanto riscontrato in letteratura. Infatti, un recupero totale pari al 100% è difficile se non quasi impossibile a causa dell'eccessivo maneggiamento del campione previsto da questa tecnica analitica (es., reagenti chimici utilizzati, centrifugazione, trasferimento dalle beute alle vials e viceversa, recupero delle soluzioni, filtrazione, acidificazioni).

I risultati ottenuti dall'estrazione sequenziale selettiva eseguita sui campioni di suolo normalizzati a cento evidenziano come le frazioni F1 e F2, le più solubili, rappresentino una percentuale molto ridotta del Hg estratto e, tra le due, la maggior parte del Hg risulta estratta nella frazione F1, indicando quindi la presenza di specie mercurifere già solubili in acqua. Per il

primo set di campioni, questa evidenza è più rimarcata nel campione HM7, la cui percentuale di Hg estratto dall'acqua (F1) è pari a 7,2 %; tale frazione è risultata anche superiore alla percentuale ottenute dalla somma delle frazioni F2 e F3 (Tab. 4 e Fig. 6). Ad ogni modo, escludendo il campione HM7, per tutti gli altri suoli, la somma delle prime due frazioni (F1+F2) è risultata inferiore al 2,1%, con un valore medio pari allo 1,2%. La frazione F3, indicativa del Hg legato alla sostanza organica e, in particolare, agli acidi umici, è risultata percentualmente sempre superiore alle prime due frazioni, F1 e F2, ad eccezione dei campioni AB8 (F3=1,7%) e HM7 (F3=3,0%). Decisamente preponderante sulle altre frazioni, la percentuale riscontrata nella frazione F4, da un minimo di 84,3% (HM7) ad un massimo di 92,1% (AB8), con un valore medio di 88,2%.

Tabella 4 *– Valori percentuali del Hg associato alle singole frazioni ottenute dall'estrazione sequenziale selettiva applicata ai primi 7 campioni di suolo*

Sigla	F1 %	F2 %	F3 %	F4 %	F5 %
T3L	0,5	0,0	2,3	88,8	8,4
3A1	0,9	0,1	2,1	90,2	6,8
AB8	2,1	0,0	1,7	92,1	4,0
FF8	1,3	0,1	4,4	89,1	5,2
ES4	1,2	0,0	2,3	86,5	10,0
HM7	7,2	0,1	3,0	84,3	5,4
7B4	1,0	0,0	2,0	86,2	10,8

La maggior parte del Hg estratto (mediamente il 95,4%) è risultata pertanto inclusa nelle ultime due frazioni di tutti i campioni analizzati, con un intervallo di valori, in termini di percentuale, superiore di un ordine di grandezza nella frazione F4 (84,3-92,1%) rispetto alla frazione F5 (4,0-10,8%).

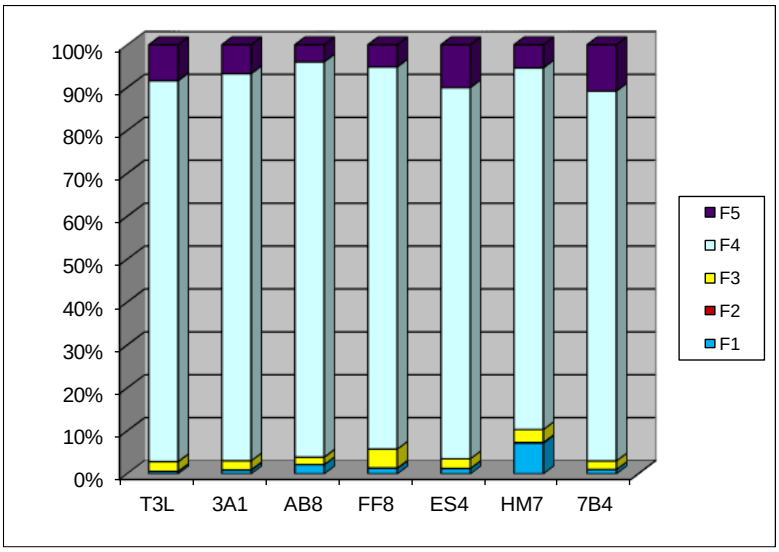


Figura 6 - Istogrammi con le singole percentuali di mercurio estratte dalle 5 frazioni normalizzate a cento.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalla medesima procedura eseguita sul secondo set di campioni di suolo, sempre normalizzati a cento, anche in questo caso si evidenziano come le frazioni F1 e F2 rappresentino la minor percentuale di Hg estratto, con prevalenza nella frazione F1 sulla F2. Questo aspetto è evidente per i campioni n°4, n°5 e n°9, le cui percentuali di Hg estratto nella frazione F1 sono pari al 2,4, 1,9 e 7,2 % rispettivamente, anche superiori alle percentuali ottenute sommando le frazioni F2 e F3 (Tab. 5 e Fig. 7).

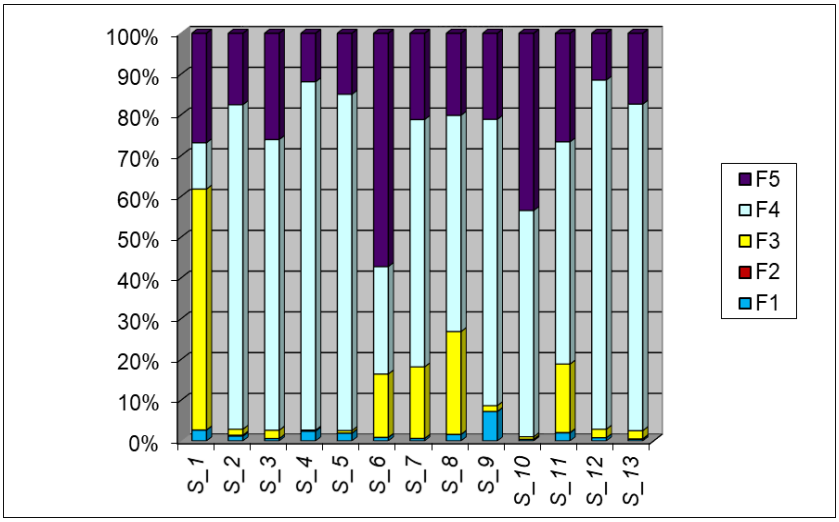
Ad ogni modo, per tutti e 13 i campioni di suolo, la somma delle prime due frazioni (F1+F2) è risultata inferiore al 2,7 %, con un valore medio pari a 1,8%. Ad eccezione dei tre campioni sopra menzionati (n°4, n°5 e n°9), la frazione F3 è risultata percentualmente sempre superiore alle prime due frazioni (F1 e F2) e compresa tra il 15,5% e il 59,1%, particolarmente evidente nei campioni n°1, n°6, n°7, n°8 e n°11. La percentuale riscontrata nella frazione F4 prevale sulle altre frazioni, variando da un minimo di 53,0 % (n°8) ad un massimo di 85,7% (n°12), escluso il campione n°1 per il quale è la frazione F3 (59,1%) ad essere quella preponderante.

Tabella 5 *– Valori percentuali del Hg associato alle singole frazioni ottenute dall'estrazione sequenziale selettiva applicata ai 13 campioni di suolo*

Sigla (n°)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F5 (%)
1	2,6	0,1	59,1	11,4	26,9
2	1,2	0,2	1,5	79,6	17,5
3	0,6	0,0	2,0	71,3	26,1
4	2,4	0,0	0,2	85,5	11,9
5	1,9	0,0	0,6	82,5	15,0
6	0,8	0,0	15,5	26,4	57,2
7	0,6	0,0	17,6	60,7	21,2
8	1,6	0,0	25,2	53,0	20,1
9	7,2	0,0	1,4	70,2	21,1
10	0,4	0,0	0,6	55,5	43,5
11	2,0	0,1	16,8	54,5	26,6
12	0,8	0,0	2,1	85,7	11,5
13	0,4	0,1	2,0	80,1	17,4

Sempre escludendo il campione n°1, per tutti gli altri campioni la maggior parte del Hg estratto, mediamente il 91,2%, è risultato incluso nella somma delle ultime due frazioni (F4+F5), con un intervallo di valori percentuale superiore nella frazione F4 (53,0-85,7%) rispetto alla frazione F5 (11,5-57,2%). Soltanto per il campione n°6, la frazione F5 (57,2%) presenta una percentuale pari a più del doppio rispetto alla frazione F4 (26,4%).

Figura 7 - Istogrammi con le singole percentuali di mercurio estratte dalle 5 frazioni normalizzate a cento.



4 CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SUI RISULTATI

Come evidenziato da diversi autori (Bloom et al., 2003; Shi et al., 2005; Issaro et al., 2009), le frazioni F1 e F2 rappresentano i composti più solubili del Hg, più mobili e facilmente scambiabili dai suoli/sedimenti. La somma delle frazioni F1 e F2 può essere considerata un buon indicatore della percentuale di Hg potenzialmente accessibile agli organismi ed in particolare ai batteri capaci di trasformare le forme inorganiche del Hg in metil-Hg, più tossico e facilmente accumulabile lungo la catena trofica.

Nel primo set di campioni sottoposti all'estrazione sequenziale, la somma delle frazioni F1 e F2 varia tra 0,6% e 2,1% del Hg estratto, escludendo il campione HM7 per il quale la sommatoria risulta più elevata (7,3%), e pertanto non costituiscono un elemento di particolare attenzione rispetto alla potenziale «mobilità» dell'elemento associato a tali suoli. Per il campione HM7, invece, la situazione potrebbe essere in considerazione del risultato ottenuto, in altre parole il Hg presente potrebbe essere potenzialmente più biodisponibile rispetto agli altri suoli. La frazione F3, indicativa del Hg legato alla sostanza organica (organo-chelato) ed in particolare agli acidi umici, il cui legame è essenzialmente dovuto alla grande capacità di scambio ionico di questi ultimi, è anch'essa poco presente nei suoli considerati e rappresenta mediamente 2,5% del Hg estratto, variando da un minimo di 1,7% ad un massimo di 4,4% a seconda del campione. Seppur la mobilità di questa specie sia inferiore a quella delle frazioni F1 e F2, le percentuali estratte sono risultate superiori (Tab. 3 e Fig. 6). Questa situazione potrebbe essere spiegata dalla presenza di una forma mercurifera clorata nei suoli, Hg_2Cl_2, presumibilmente legata all'impianto soda-clora (Huremović et al., 2017). Interessante notare, inoltre, che diversi autori (Bloom et al., 2003; Fernández-Martínez e Rucandio, 2014) sostengono che questa forma chimica del Hg sia probabilmente la più importante e la più correlabile con il potenziale di metilazione qualora ci siano le condizioni ambientali favorevoli per l'attività batterica capace di metilare il Hg inorganico. Infatti, la mobilità e la biodisponibilità del Hg dipendono anche dalle condizioni redox del sistema, che possono favorire il rilascio del Hg nel caso di un elevato tasso di degradazione della sostanza organica, condizione che potrebbe verificarsi, ad esempio, in caso di anossia spinta e prolungata nel tempo, evento comunque raro e conseguente a particolari condizioni ambientali.

La netta prevalenza della frazione F4 (mediamente ≈88%), anche rispetto alla F5 (mediamente ≈7%), indica che le forme di Hg presenti nei suoli sono prevalentemente legate in "complessi forti", principalmente Hg elementare insieme alle forme di Hg legate agli organo-solfuri amorfi e

alla fase cristallina con ossidi di ferro e manganese, piuttosto che alle forme solfuree di cinabro (α-HgS), di provenienza mineraria, e metacinabro (β-HgS) rappresentate dagli estratti della F5. In entrambi i casi, si tratta di composti normalmente poco solubili e poco bio-accessibili, che possono rilasciare significative quantità di Hg solo in casi eccezionali di anossia spinta e prolungata nel tempo. Infatti, le frazioni F4 e F5, costituendo complessivamente il ≈95% del Hg estratto, fa ritenere che la mobilità del Hg dai suoli sia ridotta, considerata la scarsa solubilità dei composti associati a queste frazioni. Il cinabro (HgS), ad esempio, possiede una solubilità bassissima con una Kps ≈ $10^{-36,8}$ (Ravichandran, 2004).

Per quanto riguarda il secondo set di suoli, similmente al primo, la sommatoria delle percentuali del Hg estratto dalle prime due frazioni varia tra 0,4% e 2,7% con una eccezione, il campione n°9, per il quale la somma di F1+F2 è risultata più elevata (7,2%). Pertanto, come precedentemente affermato per il campione HM7, anche il Hg presente nel campione n°9 potrebbe essere potenzialmente più biodisponibile.

La frazione F3, indicativa di un Hg meno mobile rispetto alle prime due frazioni, è mediamente pari a 7,1% e le percentuali variano all'interno di un intervallo molto più ampio rispetto a quelle del primo gruppo, compreso tra 0,2% e 25,2% (Tab. 5 e Fig. 7). Da questa media è stato escluso il campione n°1, per il quale la sola frazione F3 rappresenta il 59,1% di Hg estratto. Sulla base di tale evidenza è possibile ipotizzare che il Hg presente in questa frazione sia quello prevalentemente legato al carbonio organico degli acidi umici (Protano e Nannoni, 2018) piuttosto che ad altri composti organici e/o adsorbito da ossidi e idrossidi di Fe e Mn e/o incluso nella matrice minerale (es. cinabro). Ipotesi rafforzata, inoltre, dalle basse percentuali di Hg riscontrate nelle frazioni F4 (11.4%) e F5 (26.9%) rispetto agli altri campioni, per i quali, al contrario, si evidenzia una frazione F4 (≈67,1%) mediamente superiore.

Il Hg estratto dalla frazione F4 è risultato anche superiore rispetto alle percentuali estratte dalla frazione F5 (≈24,1%), indicando quindi che il metallo presente nei suoli è prevalentemente legate in "complessi forti", siano essi di natura organica (ad es. i composti organici contenenti lo zolfo nel gruppo funzionale) e/o inorganica (ad es. ossidi e idrossidi di Fe e Mn). Tenendo conto della somma delle frazioni F4 e F5 (mediamente ≈91,2%) del Hg estratto (escludendo il campione n°1), si ritiene che la mobilità del metallo dai suoli sia ridotta e che quindi, anche in questo caso, si tratta di composti poco solubili e poco biodisponibili. Resta comunque da non sottovalutare il Hg estratto dalla frazione F3 nei campioni n°1, n°6, n°7, n°8 e n°11 (Fig. 7), risultata piuttosto elevata (15,5-59.1%) e quindi più correlabile con il potenziale di metilazione.

La disponibilità di ulteriori dati relativamente a parametri chimico-fisici complementari sui campioni di suolo aiuterebbero nell'interpretazione dei risultati dell'analisi speciativa. A tal

proposito, alcuni studi hanno dimostrato come l'associazione fra le forme di Hg presenti nei suoli siano dipendenti perlopiù dalle caratteristiche pedologiche dell'area di studio (Kocman et al., 2004; Reis et al., 2010; Huremović et al., 2017). Pertanto, informazioni sulla mineralogia (es. presenza di minerali argillosi), sulla presenza di composti inorganici come ossidi/idrossidi (Kim et al., 2004; He et al., 2007), sulle caratteristiche inerenti al tipo di sostanza organica (es. gruppi funzionali prevalenti, micro/macro molecole) ed il pH (Sánchez et al., 2005) potrebbero fornire importanti indicazioni sul frazionamento del Hg nel suolo (Reis et al., 2010). La procedura di estrazione sequenziale condotta da Reis et al. (2010), ad esempio, eseguita su campioni di suolo contaminato da Hg derivante da un impianto soda-cloro (Estarreja, costa nord-occidentale del Portogallo) ha evidenziato una prevalenza preponderante della frazione di Hg "semi-mobile" (più del 90% del Hg totale, e corrispondente alle nostre frazioni F3 e F4) su quella "mobile" e "non-mobile". Inoltre, conoscendo il pH, la granulometria e il contenuto di alcuni elementi come Al, Fe, Mn e S nel suolo è stato possibile affermare che parte del Hg presente in quella frazione è stato rilasciato a seguito della riduzione degli ossidi/idrossidi di Mn e Al, avvenuta durante la procedura di estrazione. Viceversa, la sostanza organica ed i solfuri hanno contribuito, in tal caso, a trattenere il Hg nella matrice suolo riducendone la mobilità.

In conclusione, benché l'effettiva mobilità del Hg dal suolo sia dipendente da numerosi fattori ambientali, alcuni dei quali (come l'anossia spinta) non facilmente riscontrabili in condizioni normali, la distribuzione del Hg nelle diverse frazioni ottenute dall'estrazione sequenziale selettiva, risultata fortemente associata alle frazioni meno mobili, induce a ritenere che la mobilità, il trasferimento e l'eventuale biodisponibilità del Hg dai suoli analizzati non sia particolarmente spinta, anche se la frazione solubile in acqua (es. i campioni AB8 e HM7 del primo gruppo) e la frazione riscontrata in F3 (es. i campioni n°1, n°6, n°7, n°8 e n°11 del secondo gruppo) non è da trascurare.

In prospettiva futura, si potrebbero eseguire sperimentazioni in laboratorio ed *in situ* al fine di comprendere meglio le dinamiche legate alla rimobilizzazione ed alla biodisponibilità del Hg dal suolo. Nei suoli contaminati da Hg, il comportamento del metallo in termini di mobilità e biodisponibilità non può essere associato solo all'esclusivo effetto della concentrazione totale presente quanto piuttosto ad un insieme di fattori ambientali sito-specifici, tra cui le caratteristiche granulometriche, la qualità e quantità della sostanza organica e le condizioni redox del sistema, informazioni queste, utili a migliorare il quadro interpretativo.

Riferimenti bibliografici

Bloom N.S., Preus E., Katon J., Hiltner M., 2003. Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. Analytica Chimica Acta, 479, 233–248.

Fernández-Martínez R., Rucandio I., 2014. Total mercury, organic mercury and mercury fractionation in soil profiles from the Almadén mercury mine area. Environmental Science: Processes Impacts, 16, 333–40.

He Z., Traina S.J., Weavers L.K., 2007. Sonolytic desorption of mercury from aluminum oxide: effects of pH, chloride, and organic matter. Environ. Sci. Technol. 41, 779–784.

Huremović J., Horvat M., Kotnik J., Kocman D., Žižek S., Guevara S.R., Muhić-Šarac T., Memić M., 2017. Characterization of Mercury Contamination Surrounding a Chloralkali Production Facility in Tuzla, Bosnia and Herzegovina. Analytical Letters, 50, 6, 1049-1064

Kim C.S., Rytuba J.J., Brown G.E., 2004. EXAFS study of mercury(II) sorption to Fe and Al-(hydr)oxides: I. Effects of pH. Journal of Colloid and Interface Science 271, 1–15.

Kocman D., Horvat M., Kotnik J., 2004. Mercury fractionation in contaminated soils from the Idrija mercury mine region. Journal of Environmental Monitoring, 6, 696–703.

Issaro N., Abi-Ghanem C., Bermond A., 2009. Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. Analytica Chimica Acta, 631, 1–12.

Protano G., Nannoni F., 2018. Influence of ore processing activity on Hg, As and Sb contamination and fractionation in soils in a former mining site of Monte Amiata ore district (Italy). Chemosphere, 199, 320-330.

Ravichandran M., 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter - a review. Chemosphere, 55, 319-331.

Reis A.T., Rodrigues S.M., Davidson C.M., Pereira E., Duarte A. C., 2010. Extractability and mobility of mercury from agricultural soils surrounding industrial and mining contaminated areas. Chemosphere 81, 11, 1369–1377.

Sánchez D.M., Quejido A.J., Fernández M., Hernández C., Schmid T., Millán R., González M., Aldea M., Martín R., Morante R., 2005. Mercury and trace element fractionation in Almaden soils by application of different sequential extraction procedures. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381, 8, 1507–1513.

Shi J., Liang L., Jiang G., Jin X., 2005. The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. Environment International, 31, 357– 365.

ALLEGATO 5

Relazione tecnica di ISPRA

ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente

CENTRO NAZIONALE PER LA RETE NAZIONALE DEI LABORATORI

SIN BRESCIA-CAFFARO

RELAZIONE TECNICA

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEI DATI ANALITICI SU CAMPIONI DI SUOLI E BIOMASSE VEGETALI PRODOTTI NELLA SPERIMENTAZIONE DI TECNICHE DI BIORIMEDIO IN SERRA DEL SIN BRESCIA-CAFFARO.

Autori:
Stefania Balzamo, Elisa Calabretta

SOMMARIO

Introduzione 4

Scopo del documento 4

Attività di validazione (Fase 1) 5

Campioni di Assicurazione e Controllo di Qualità (QA/QC) 13

Considerazioni 16

Attività di validazione (Fase 2) 17

Metodi di analisi utilizzati da INDAM per i parametri PCB, PCDD/F e metalli nelle biomasse vegetali e nei suoli 18

Risultati 20

Conclusioni 27

Introduzione

L'ERSAF Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste è stata incaricata dalla Regione Lombardia (lettera di incarico n. 17688/RCC del 14 marzo 2013) della "Realizzazione delle attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni delle arre agricole nel Sito di Interesse Nazionale di Brescia- Caffaro, come definite all'art 3, punto E del relativo Accordo di programma".

In seguito a tale incarico ERSAF ha stipulato accordi di collaborazione con il Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia (DSAT) dell'Università degli Studi dell'Insubria e con il Dipartimento di Scienza per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS) dell'Università degli Studi di Milano per la collaborazione tecnico-scientifica finalizzata al biorimedio dei terreni delle aree agricole del SIN Brescia- Caffaro e loro successiva bonifica. Il DSAT si è avvalso inoltre della collaborazione del Dipartimento di Ingegneria Chimica Materiali Ambiente (DICMA) della Università degli Studi di Roma "La Sapienza", per le competenze di carattere geostatistico e di analisi spaziale.

Nei primi due anni di attività di collaborazione sono stati predisposti i protocolli per la valutazione spaziale delle contaminazione in tre aree agricole rappresentative del SIN, ciò ha permesso di ottenere informazioni sulla distribuzione dei contaminati. DSAT e DeFENS in particolare hanno poi definito i protocolli per la sperimentazione in microcosmo (serra) e in parcelle (campo) al fine di determinare le specie vegetali più efficienti e le condizioni più adatte al biorimedio (stimolazione dell'attività dei microrganismi autoctoni del suolo di degradazione degli inquinanti organici o la fitoestrazione dei metalli (rhizoremediation/phytoextraction).

Nel protocollo di sperimentazione in serra è stato dettagliato il disegno sperimentale che ha previsto dieci trattamenti (T) saggiati su un suolo campione prelevato dal SIN ed opportunamente, che corrispondono a sei specie vegetali selezionate, in diverse combinazioni e condizioni e i controlli (C), nel numero di sette, fondamentali per verificare che siano i trattamenti (cioè le specie vegetali) responsabili dell'azione di biorimedio e non il suolo esposto alle varie condizioni sperimentali (ad es. invasamento irrigazione etc). Per ciascun Trattamento e Controllo e per ogni tempo di campionamento per un totale di cinque campionamenti, sono stati predisposti tre vasi identici così da ottenere tre repliche.

Tale disegno sperimentale è stato applicato al campionamento di due diverse matrici (suolo e materiale vegetale) sulle quali sono state effettuate misure chimiche e microbiologiche.

ERSAF mediante capitolato ha selezionato una azienda esterna (INDAM Laboratori Srl) per le misure chimiche di analiti organici e inorganici sui suoli e sulla biomassa vegetale ottenuti dagli esperimenti in serra. I laboratori INDAM sono Laboratorio di Prova n. 0059 (http://pa.sinal.it/350388.pdf) l'elenco delle prove accreditate, consultabile sul sito Acrredia, comprende la misura di diossine e furani, policlorobifenili e metalli in fanghi organici e inorganici, terreni, sedimenti, scorie, altri rifiuti ed assimilabili.

A marzo 2016 ERSAF e i suoi collaboratori hanno evidenziato delle perplessità sui primi dati delle analisi eseguite da Indam (tempi di campionamento t0 e t2) relativamente alla bassa variabilità dei dati tra le repliche. Alla luce di quanto rilevato il DSAT ha richiesto il supporto di ISPRA, in particolare dell'Area Metrologia del Centro Nazionale per la rete nazionale dei laboratori, per l'assicurazione della qualità del dato analitico fornito da Indam Laboratori Srl.

Scopo del documento

Scopo del documento è illustrare le attività svolte da ISPRA e le conclusioni raggiunte per l'assicurazione dei dati analitici forniti da Indam Laboratori Srl sulle misure di policlorobifenili (PCB), diossine e furani (PCDD e PCDF) e metalli in tracce (Arsenico As e Mercurio Hg) per i campioni di suolo e biomasse vegetali ottenuti dagli esperimenti in serra di biorimedio dei terreni agricoli del SIN Brescia- Caffaro per la progettazione della loro bonifica.

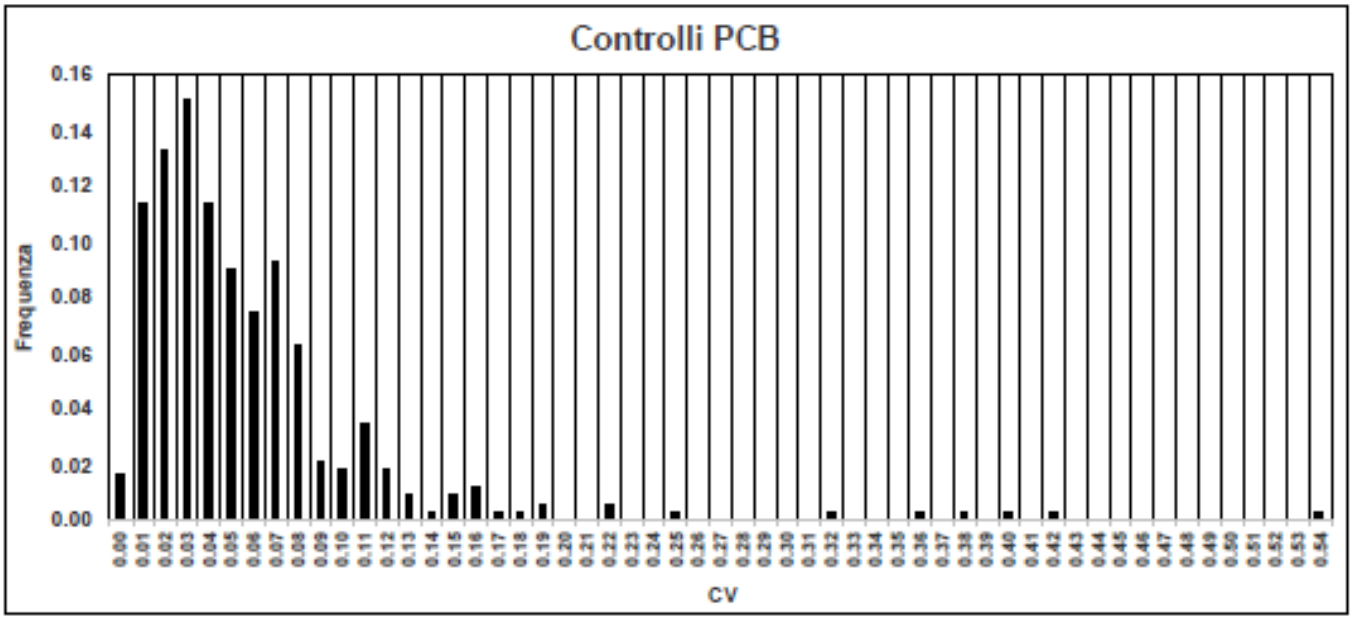
Attività di validazione (Fase 1)

I risultati prodotti nel marzo 2016 da INDAM Laboratori S.r.l, per un totale di 74 campioni, sono stati contestati dai consulenti scientifici di ERSAF (DSAT e DeFENS) che hanno espresso riserve sull'attendibilità dei dati analitici prodotti, riguardo in particolare, ai bassi coefficienti di variabilità dei valori delle tre repliche di campioni della stessa tesi sperimentale.
Infatti il Prof. Di Guardo dell'Università dell'Insubria, la Prof.ssa Sara Bodin dell'Università degli Studi di Milano e i loro collaboratori hanno valutato i risultati delle misure eseguite da INDAM Laboratori Srl nel documento "Relazione tecnico scientifica- Problematiche riscontrate nel processo di valutazione dei dati di analisi del suolo, forniti da INDAM Laboratori srl, ottenuti nell'ambito delle sperimentazioni in serra di tecniche di biorimedio" del 12/1/2017(Allegato 1) del quale si riportano di seguito i problemi riscontrati sui campioni di suolo dei vasi:

1. *Per PCB, bassissima variabilità tra le repliche dei controlli (CV% 1-4 %, ad eccezione di C6 dove è 50%); le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità simile a quella dei controlli (CV%: 1-6%) o addirittura più bassa: T1 e T10 con CV% dello 0.04% e 0.4% rispettivamente……*
2. *Per PCDF, ancora bassa cariabilità tra le repliche dei controlli (CV%: 0.3-10%), ad eccezione solo di C6 dove è ~ 130%; le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità simile a quella dei controlli (CV%: 2-8%)……*
3. *Per PCDD vi è invece elevata variabilità tra le repliche dei controlli (CV%: fino a 43%); solo in alcuni casi C1_t2, C2_t2, C4_t2, C5_t1, C7_t1 e C7_t2 la variabilità è bassa (CV%3-13 %); le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità molto più bassa (CV: 1-27%)…..*
4. *Per As e Hg, bassa variabilità tra le repliche dei controlli (CV%:0.2-5%) ad eccezione solo del C6 per Hg dove è ~15% e C4 al t2 dove è ~ 18%) le repliche dei trattamenti mostrano un range di variabilità più grande di quello dei controlli (CV%: 1-16%), fatta eccezione per P10 dove CV%: 0.1%.....*

Di seguito si riportano i grafici con le frequenza cumulative dei coefficienti di variazione percentuali (CV%) di PCB, PCDD e PCDF, sia nei controlli che nei trattamenti perché siano visualizzati con immediatezza la distribuzione dei valori di CV% per le misure degli analiti indicati.
Tali grafici sono stati estratti dal documento dal titolo "Analisi dei coefficienti di variazione nei campioni di suolo dei tempi t0 e t2" inserito nell'Allegato 1.

Figura 1- Valutazione delle frequenze dei coefficienti di variazione per PCB nei campioni di controllo



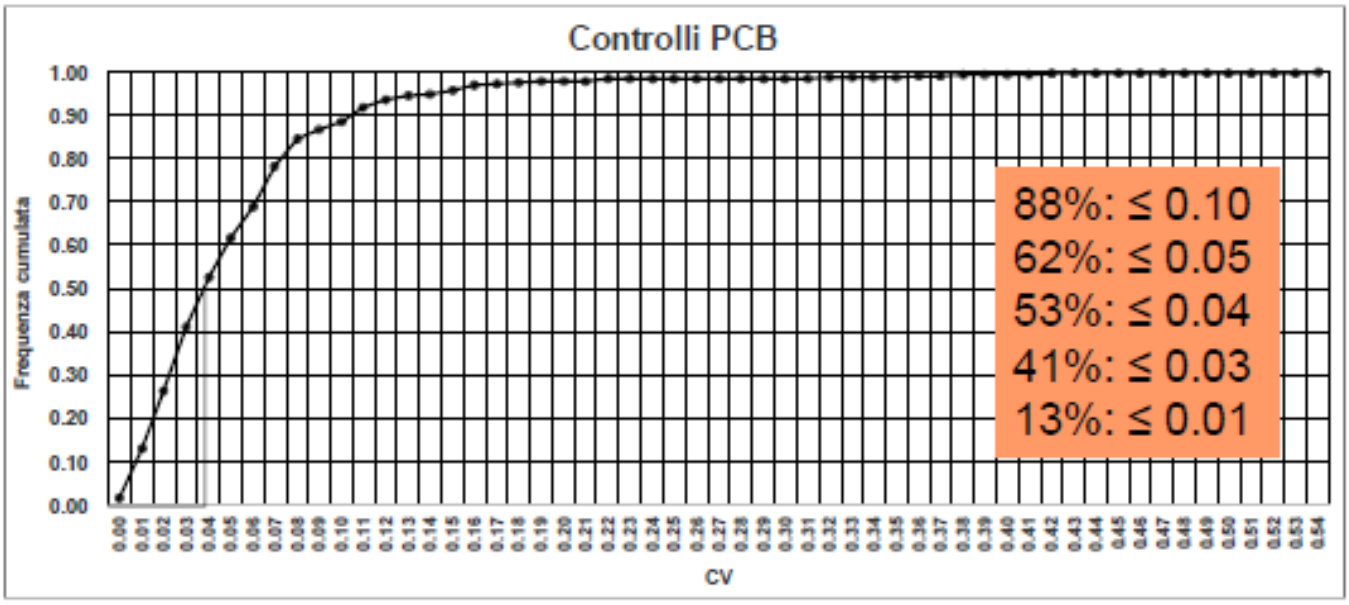


Figura 2- Valutazione delle frequenze dei coefficienti di variazione per PCB nei campioni trattati

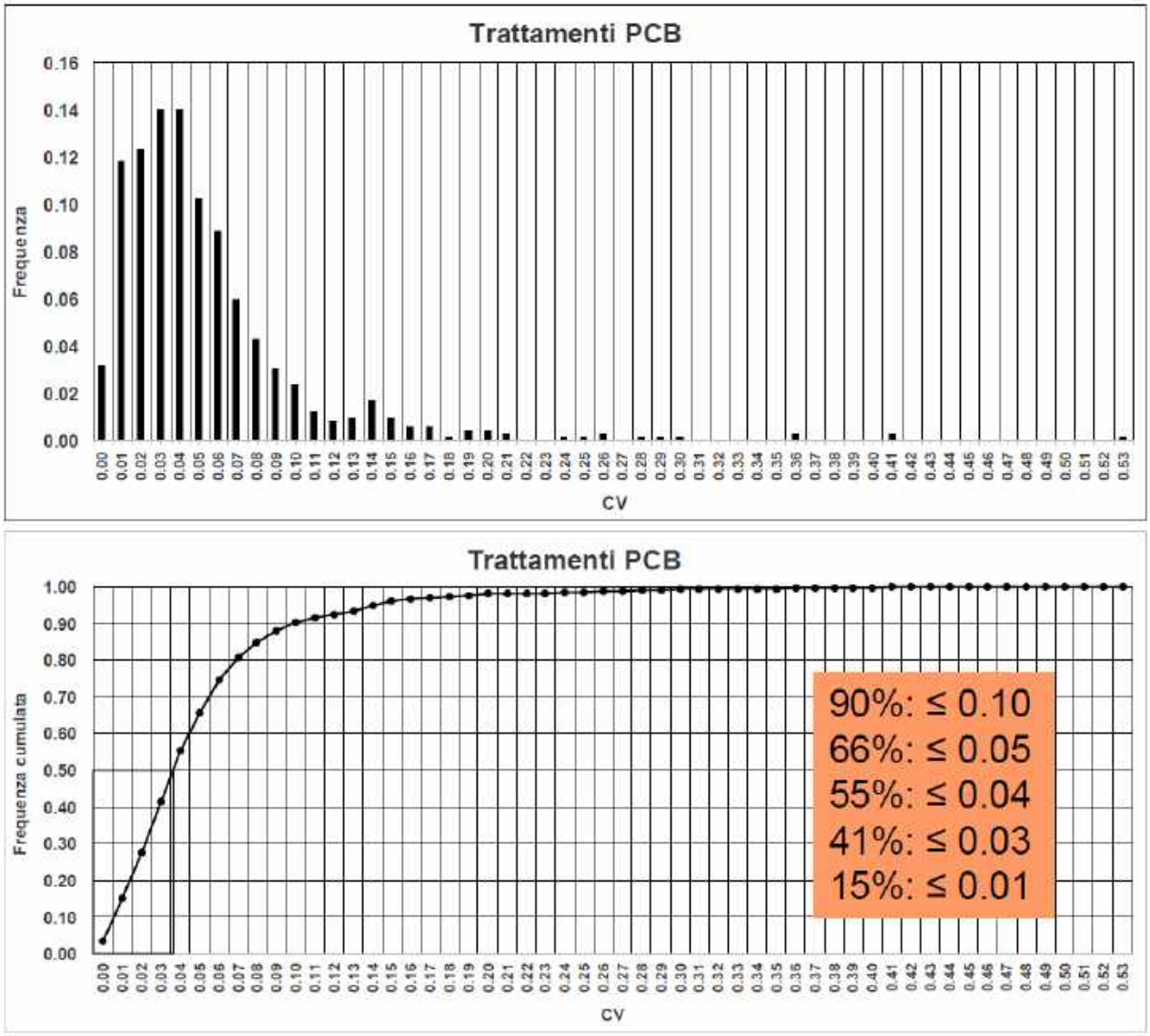


Figura 3- Valutazione delle frequenze dei coefficienti di variazione per PCDF nei campioni di controllo

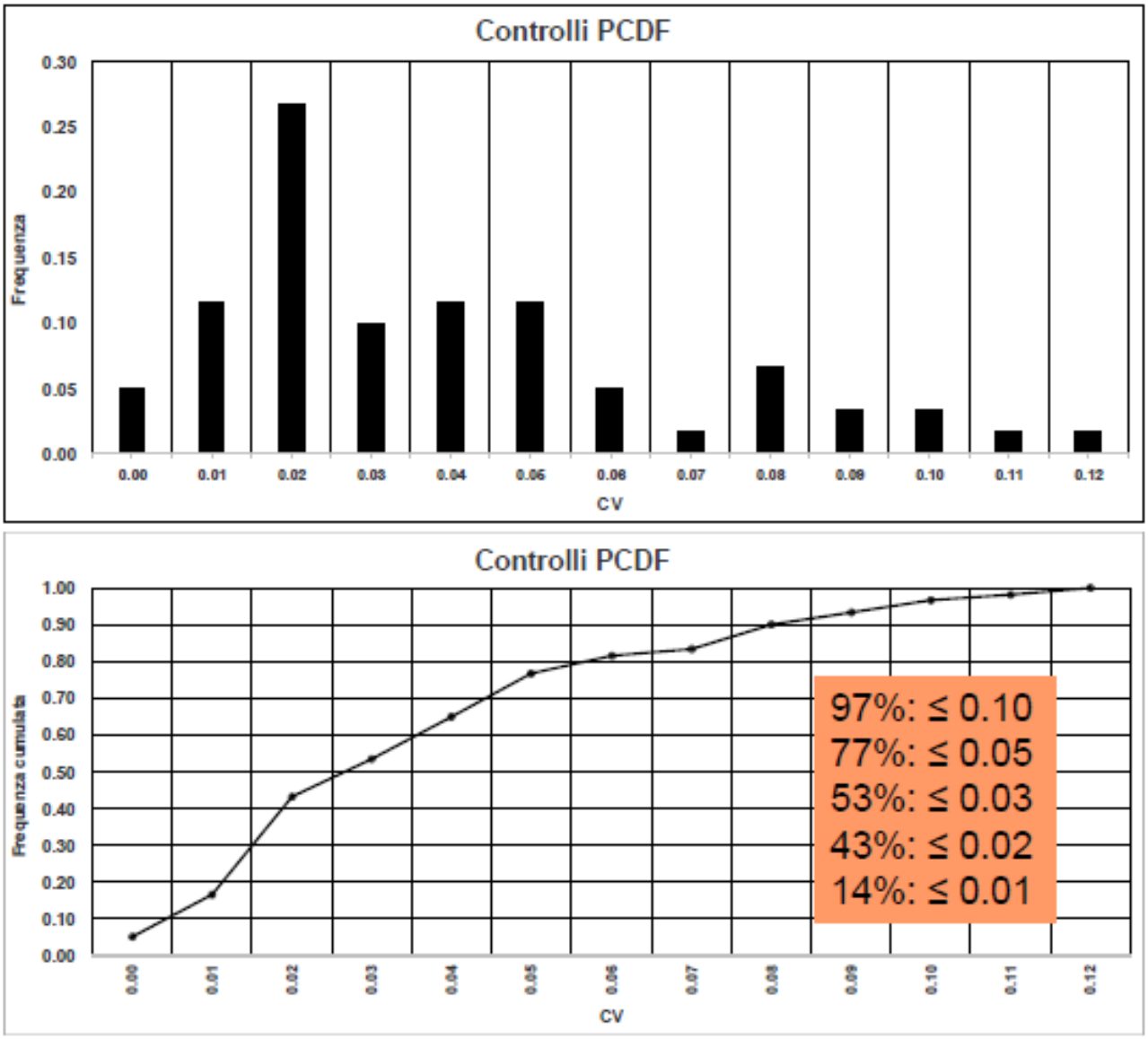


Figura 4- Valutazione delle frequenze dei coefficienti di variazione per PCDF nei campioni trattati

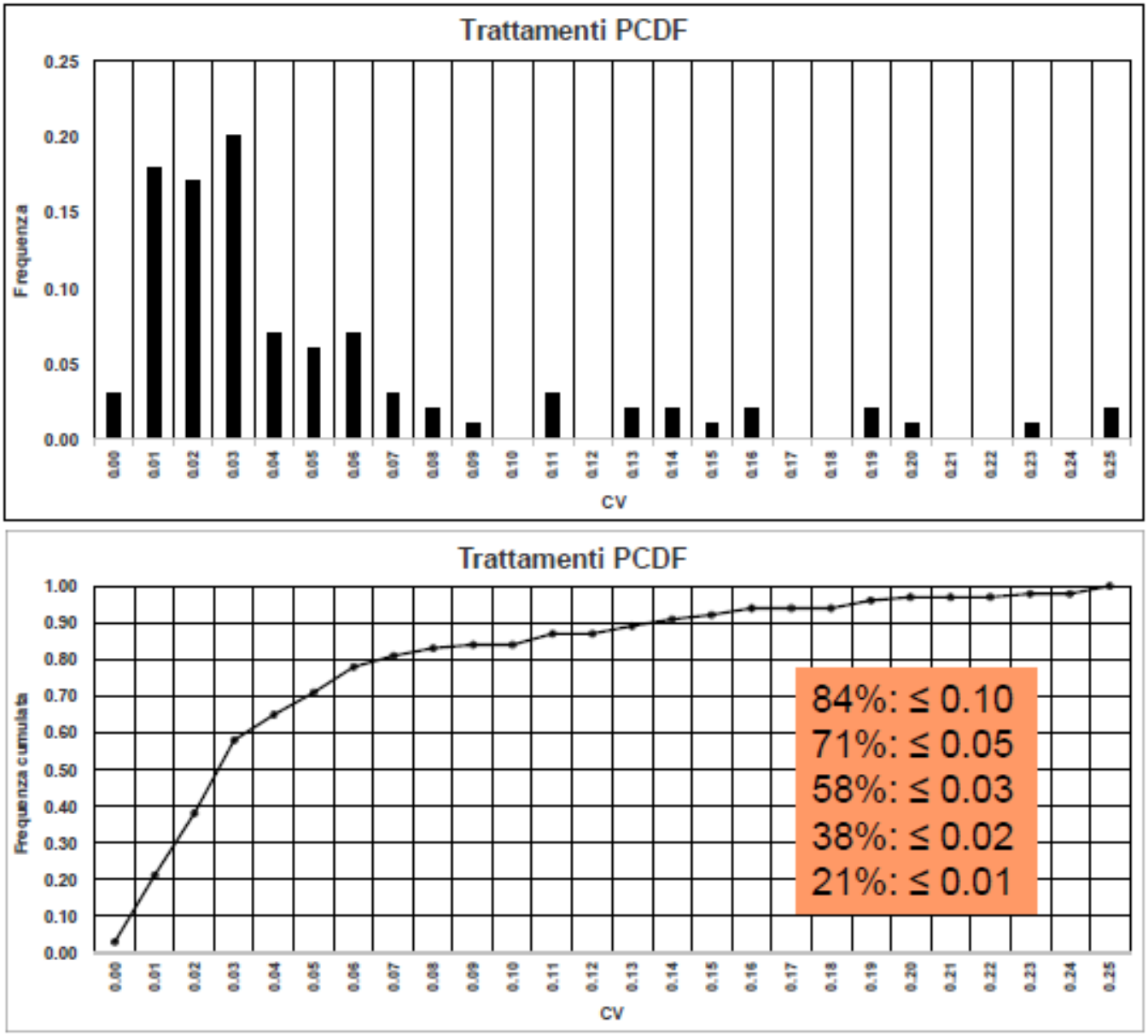


Figura 5- Valutazione delle frequenze dei coefficienti di variazione per PCDD nei campioni di controllo

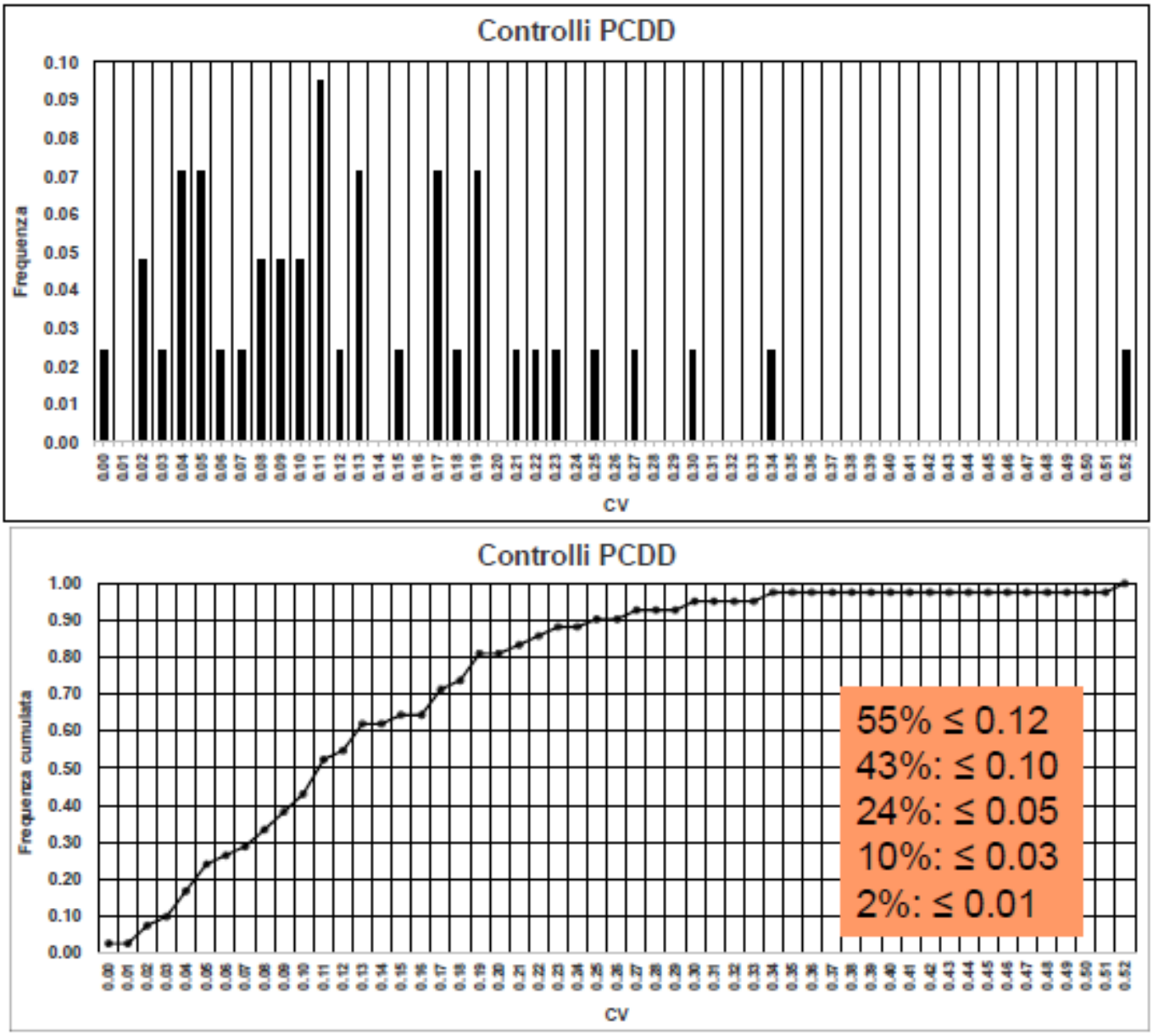
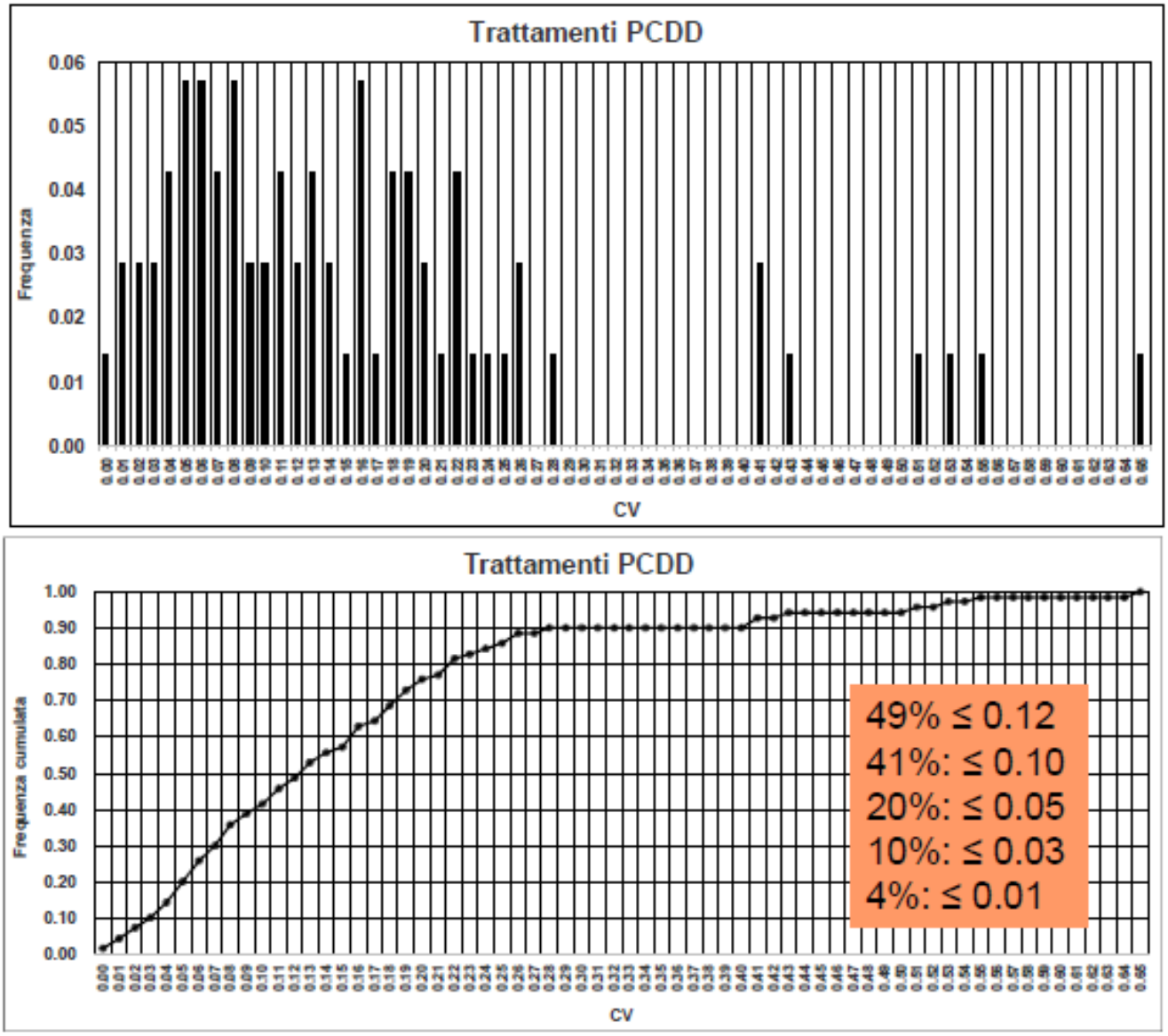


Figura 6- Valutazione delle frequenze dei coefficienti di variazione per PCDD nei campioni trattati



I problemi riscontrati dai consulenti scientifici di ERSAF sono stati discussi da DSAT e DeFENS insieme ad ISPRA a novembre 2016 come da resoconto della riunione inserito sempre all'interno dell'Allegato 1.
Durante l'incontro i tecnici ISPRA hanno concordato sul fatto che i dati presentavano una variabilità anomala, inferiore a quella di norma riscontrata nella pratica e nella letteratura analitica internazionale, per questo hanno consigliato di chiedere a INDAM Laboratori S.r.l informazioni sul trattamento e sui processi analitici cui erano stati sottoposti i campioni, per valutarne la conformità.
INDAM Laboratori S.r.l, ha inviato a d ISPRA, tramite ERSAF, le informazioni sulle procedure di misura utilizzate.
ISPRA ha quindi verificato l'attendibilità dei dati prodotti da INDAM Laboratori srl analizzando i documenti forniti, tali documenti sono quelli inseriti nell'Allegato 2.
In particolare ISPRA ha valutato:

- la partecipazione del laboratorio INDAM a circuiti interlaboratorio,

- le misure di campioni di Quality Control durante la campagna analitica della sperimentazione in oggetto,
- i risultati analitici della campagna sperimentale sulle tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro (campioni al tempo t0 e al tempo t2),
- la "Relazione tecnica sull'analisi dei microinquinanti organici e inorganici relativa al progetto Sperimentazione di tecniche di biorimedio SIN Brescia Caffaro" del 13/01/2016 e redatta su carta intestata INDAM Laboratori srl (Allegato 3).

Dall'analisi di tali documenti è risultato che:

1. la procedura di misura di PCDDFs, PCB eseguita da INDAM Laboratori Srl non ha evidenziato difformità rispetto ai metodi usualmente utilizzati. Tale procedura prevede:
   - preparazione dell'aliquota di prova del campione di suolo mediante il metodo JLC (Japanese slab cake);
   - determinazione di PCDD/PCDF in fanghi organici e inorganici, terreni, sedimenti e scorie (rifiuti) mediante metodo validato (i risultati della validazione del metodo sono riassunti nei documenti RGP107A MTH 332 rev.00 e rev.01). Il metodo interno fa riferimento al metodo EPA 1613 B (1994). Tale metodo è accreditato secondo la norma tecnica UNI CEI EN ISO IEC 17025;
   - determinazione di PCB mediante metodo validato come da documento RGP107A MTH 410 rev.0. Tale metodo fa riferimento al metodo EPA 1668 C (2010). Tale metodo è accreditato secondo la norma tecnica UNI CEI EN ISO IEC 17025;
2. durante le analisi della sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro (nell'anno 2016) INDAM non ha partecipato a Circuiti interlaboratorio per la misura di PCB e PCDDFs
3. INDAM ha condotto misure in triplicato di due Materiali di Riferimento: NIST SRM 1944 per PCDD/PCDF e UNICHIM SU-1-2-15 per PCB. Il certificato del NIST SRM 1944 costituisce l'Allegato 4.

Successivamente sono stati richiesti ad INDAM ulteriori documenti e più precisamente i rapporti di validazione dei metodi chimici utilizzati per l'analisi delle PCDD/PCDF e dei PCB. Non sono state richieste le informazioni circa la modalità di integrazione dei picchi poiché dai report di quantificazione prodotti dal software EXCALIBUR utilizzato dallo strumento Thermo Scientific TRACE GC ULTRA accoppiato allo spettrometro di massa Thermo Scientific DFS risulta che, per la maggior parte dei congeneri sia dei PCB che di PCDD/PCDF, l'integrazione è quella eseguita in automatico dal software (A automatica, M manuale).

Dall'analisi della documentazione sulla validazione dei due metodi si riscontra che la validazione è stata condotta secondo i requisiti richiesti della norma tecnica UNI CEI EN ISO IEC 17025.
Per la determinazione di PCDD/PCDF che fa riferimento al metodo EPA 1613 B (1994) risulta che la ripetibilità percentuale varia da un minimo di 9,0% ad un massimo del 13% a concentrazioni variabili da circa 9 ng/kg a circa 90 ng/kg. L'incertezza, calcolata rispetto ai Circuiti interlaboratorio a cui ha partecipato negli anni precedenti, varia rispetto al congenere ed è intorno a oltre il 50%.
Per la determinazione dei PCB, che fa riferimento al metodo EPA 1668 C (2010), risulta che la ripetibilità percentuale varia in un intervallo tra un minimo del 5,5% per il PCB99 ad un massimo del 14% per il PCB209; mentre l'incertezza estesa viene stimata tra il 29 e il 31%.

Campioni di Assicurazione e Controllo di Qualità (QA/QC)

Ispra ha elaborato i dati INDAM su i due campioni di Materiali di Riferimento NIST SRM 1944 e UNICHIM SU-1-2-15. Nelle tabelle seguenti (Tabella 1 e 2) sono riportati i dati di misura di ogni congenere per le singole repliche indipendenti, i valori di CV% e En.
En è l'indice di compatibilità secondo la norma ISO 13528:2015 "Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison", è indice dello scostamento della misura del materiale di riferimento del laboratorio rispetto al suo valore assegnato considerando le incertezze dichiarate dei due dati.
L'indice viene calcolato secondo la seguente equazione:

$$E_n = \frac{X_{LAB} - X_{RM}}{\sqrt{U(X_{LAB})^2 + U(X_{RM})^2}} \qquad (1)$$

dove:
X_{LAB} = risultato ottenuto dal laboratorio nell'analisi del Materiale di riferimento
X_{RM} = valore assegnato del Materiale di riferimento presente nel certificato del materiale di riferimento
$U(X_{LAB})$ = incertezza estesa del laboratorio nell'analisi del Materiale di riferimento
$U(X_{RM})$ = incertezza estesa del valore assegnato del Materiale di riferimento dichiarata nel certificato del materiale di riferimento

Tale indice deve essere comunque utilizzato con prudenza poiché è definito come rapporto tra due misure di prestazione separate, ma tra esse correlate. La validità dell'indice dipende quindi se l'incertezza è stata calcolata in modo appropriato. Tale valore può variare tra -1 e 1 ed indica una corretta misura del parametro e una corretta stima dell'incertezza.
Al di fuori di questo intervallo lo scostamento del risultato della misura prodotta dal laboratorio rispetto al valore assegnato del Materiale di riferimento indica che la misura o la stima dell'incertezza non sono valide.

Il calcolo dell'En per i dati INDAM è stato condotto utilizzando l'incertezza stimata da INDAM per i risultati della sperimentazione in serra per le tecniche di biorimedio sui campioni di terreno prelevati dal SIN Brescia Caffaro e l'incertezza dichiarata sul certificato del Materiale di riferimento utilizzato.

Per il materiale di riferimento NIST SRM1944 il valore di En è sempre all'interno dell'intervallo richiesto dalla norma ISO 13528:2015 e quindi le analisi condotte su questo materiale dal laboratorio possono ritenersi valide.

Tabella 1- Elaborazioni sui risultati ottenuti da INDAM sul materiale di riferimento certificato NIST SRM 1944 per PCDD/PCDF

Matrice certificata NIST SRM 1944										
data estrazione	01/12/2015	25/01/2016	06/02/2016							
data analisi	12/12/2015	28/01/2016	17/02/2016					VALORE DI RIFERIMENTO		
	prova 1 (ug/kg)	prova 2 (ug/kg)	prova 3 (ug/kg)	Media	Scarto tipo	CV%	incertezza	μ (ug/kg)	incertezza	En
2,3,7,8 TCDD	0,135	0,142	0,131	0,136	0,005	3,937	0,054	0,133	0,009	0,102038248
1,2,3,7,8 PeCDD	0,0283	0,0218	0,0223	0,024	0,004	14,877	0,010	0,019	0,002	1,03995886
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,0325	0,0262	0,0241	0,028	0,004	15,733	0,011	0,026	0,003	0,280757164
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,0763	0,0610	0,0547	0,064	0,011	17,339	0,026	0,056	0,006	0,608541484
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,0616	0,0458	0,0427	0,050	0,010	20,272	0,020	0,053	0,007	-0,280331251
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,930	0,847	0,867	0,882	0,043	4,905	0,353	0,80	0,07	0,454308555
OCDD	5,82	5,66	5,67	5,717	0,094	1,641	2,287	5,8	0,7	-0,069645013
2,3,7,8 TCDF	0,0389	0,0370	0,0400	0,039	0,002	3,922	0,015	0,039	0,015	-0,035313831
1,2,3,7,8 PeCDF	0,0424	0,0495	0,0452	0,046	0,004	7,869	0,018	0,045	0,007	0,072411798
2,3,4,7,8 PeCDF	0,0395	0,0458	0,0431	0,043	0,003	7,494	0,017	0,045	0,004	-0,249350549
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,200	0,203	0,200	0,201	0,002	0,756	0,080	0,22	0,03	-0,444384395
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,0910	0,0968	0,0930	0,094	0,003	3,151	0,037	0,09	0,01	0,185597518
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,0647	0,0655	0,0612	0,064	0,002	3,530	0,026	0,054	0,006	0,746837251
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,0157	0,0160	0,0148	0,016	0,001	4,150	0,006			
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	1,02	1,07	1,00	1,030	0,033	3,187	0,412	1,0	0,1	0,139300152
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0,0439	0,0463	0,0446	0,045	0,001	2,757	0,018	0,040	0,006	0,517053723
OCDF	1,06	0,98	1,19	1,075	0,106	9,873	0,430	1,0	0,1	0,338305888

Le incertezze dei valori di riferimento dei PCB sulla Matrice UNICHIM SU-1-2-15 (utilizzata da INDAM come CRM) non sono riportate poiché nella documentazione fornita da UNICHIM, vengono riportati solo i valori di CV% derivanti da circuiti interlaboratorio; conseguentemente il Materiale di Riferimento non è corredato dalla valutazione dell'incertezza. In questo caso si è proceduto al calcolo dell'indice di compatibilità En solo con l'uso dello scarto tipo ricavato dal dato del CV%.

Per il materiale di riferimento certificato UNICHIM SU 1-2-15 il valore di En è spesso superiore ad 1 e quindi i risultati dell'analisi condotta da INDAM su questo materiale sembrano meno attendibili. In questo caso bisogna comunque tener conto del fatto che il calcolo del coefficiente En è stato effettuato mettendo in relazione lo scarto tipo e non le incertezze come richiesto dalla norma tecnica sopracitata.

Inoltre, nella valutazione di questi risultati, si possono fare le seguenti considerazioni:

- Per PCDD/PCDF: CV%= 0,76-20,00% la variabilità nell'analisi del CRM è maggiore rispetto a quella generalmente riscontrata nei congeneri dei campioni. Infatti nelle analisi effettuate da INDAM si è evidenziato che il 55% delle repliche dei controlli e il 49% delle repliche dei trattamenti hanno un CV% compreso all'interno dell'intervallo 1-12%.
- Per PCB: CV%= 1-17% è la variabilità nell'analisi del CRM; mentre per le repliche di circa il 90% dei campioni (sia di controllo che trattati) hanno un CV% compreso all'interno dell'intervallo 1-10%. Anche in questo caso la variabilità nell'analisi del CRM è maggiore di quella riscontrata nei campioni.

Tabella 2- Elaborazioni sui risultati ottenuti da INDAM sul materiale di riferimento certificato UNICHIM SU-1-2-15 per i PCB

Matrice UNICHIM SU-1-2-15												
data estrazione	03/02/2016	06/02/2016	10/02/2016									
data analisi	24/02/2016	29/02/2016	29/02/2016					VALORE DI RIFERIMENTO				
Parametro	prova 1 (ng/kg)	prova 2 (ng/kg)	prova 3 (ng/kg)	Media	scarto tipo	CV	CV%	µ (ng/kg)	scarto tipo	CV	CV%	En con scarto tipo
PCB 81	176	191	185	184	7	0,04	4	156	39,312	0,252	25,2	1,3
PCB 77	4335	4624	4603	4521	161	0,04	4	4245	1044,27	0,246	24,6	0,5
PCB 123	2188	2287	2280	2251	55	0,02	2	2022	483,258	0,239	23,9	0,9
PCB 118	109700	121448	115284	115477	5876	0,05	5	99266	20150,998	0,203	20,3	1,4
PCB 114	3534	3587	3503	3541	43	0,01	1	2438	524,17	0,215	21,5	4,2
PCB 105	55663	57556	55241	56153	1233	0,02	2	47702	8204,744	0,172	17,2	2,0
PCB 126	913	940	880	911	30	0,03	3	778	128,37	0,165	16,5	1,9
PCB 167	8948	9601	9084	9211	345	0,04	4	8820	1023,12	0,116	11,6	0,6
PCB 156	16409	21734	19920	19354	2707	0,14	14	18552	3135,288	0,169	16,9	0,3
PCB 157	4816	5291	4752	4953	295	0,06	6	4628	874,692	0,189	18,9	0,6
PCB 169	83	115	109	102	17	0,17	17					
PCB 189	4252	4699	4459	4470	224	0,05	5	4192	779,712	0,186	18,6	0,6
PCB 1	509	563	591	554	42	0,08	8					
PCB 3	515	538	540	531	14	0,03	3					
PCB 4	1557	1751	1759	1689	114	0,07	7					
PCB 15												
PCB 19	1064	1161	1176	1133	61	0,05	5					
PCB 37	7311	8268	8416	7998	600	0,07	7					
PCB 54	69	68	77	71	5	0,07	7					
PCB 104												
PCB 155												
PCB 188												
PCB 202	12341	12865	12416	12541	283	0,02	2					
PCB 205	4584	5154	4728	4822	296	0,06	6					
PCB 208	8705	9198	8544	8815	341	0,04	4					
PCB 206	34218	42842	33074	36711	5340	0,15	15					
PCB 209	1451345	1633110	1780138	1621531	164702	0,10	10					
PCB 28	31041	33928	35654	33541	2331	0,07	7	22820	3582,74	0,157	15,7	3,6
PCB 52	55223	57758	55672	56217	1352	0,02	2	54997	8854,517	0,161	16,1	0,3
PCB 95	47951	52339	51994	50761	2440	0,05	5	43557	7535,361	0,173	17,3	1,6
PCB 99	35383	37777	37523	36894	1315	0,04	4	31069	5623,489	0,181	18,1	1,9
PCB 101 + 90	90275	97803	96785	94954	4084	0,04	4	81677				3,3
PCB 110	74133	80406	79046	77861	3300	0,04	4	72091	12471,743	0,173	17,3	0,8
PCB 128	29933	33409	31537	31626	1739	0,05	5	20324	2642,12	0,13	13,0	5,2
PCB 138	164542	179709	168973	171075	7799	0,05	5	147058	29411,6	0,2	20,0	1,4
PCB 146	29232	30589	29378	29733	744	0,03	3	23044	4401,404	0,191	19,1	2,9
PCB 149	141672	146110	139889	142557	3204	0,02	2	99500	17213,5	0,173	17,3	4,7
PCB 151	51227	50463	49392	50361	922	0,02	2	35955	7838,19	0,218	21,8	3,6
PCB 153 + 168	287686	295040	289126	290617	3897	0,01	1	226145				
PCB 170	72710	77337	72470	74172	2744	0,04	4	80871	22805,622	0,282	28,2	-0,6
PCB 177	43047	43076	42290	42804	446	0,01	1	32700	7651,8	0,234	23,4	2,6
PCB 180	166341	181399	166574	171438	8627	0,05	5	156720	38866,56	0,248	24,8	0,7
PCB 183	19970	19461	19133	19521	421	0,02	2	15896	3513,016	0,221	22,1	2,0
PCB 187	154265	144240	143892	147466	5891	0,04	4	118242	26486,208	0,224	22,4	2,0

Considerazioni

La valutazione della documentazione prodotta da INDAM ed elencata in Allegato 2, non ha permesso di individuare quali siano le cause di una variabilità così bassa ottenuta sui risultati dei campioni sperimentali. Inoltre, poiché nella documentazione presentata non ci sono i risultati di prove valutative relative a PCDD/PCDF e PCB, non si può dare una valutazione sulla prestazione del laboratorio per l'anno 2016 su tali parametri. Infatti il laboratorio ha partecipato a prove valutative solo su metalli e IPA e non sugli analiti che riguardano la presente trattazione.
Si può soltanto notare che generalmente la variabilità dei risultati sui CRM e quella della validazione dei due metodi è maggiore di quella riscontrata nei risultati dei campioni sperimentali.
ISPRA ha pertanto consigliato di procedere con le misure dei campioni della sperimentazione per verificare se i problemi riscontrati per questo primo set di misure sono confermati.

In generale si sottolinea l'importanza e la necessità di pianificare le attività analitiche (committente – esecutore) tenendo conto prima dell'inizio delle misure sperimentali di attività specifiche per l'assicurazione e il controllo della qualità del dato (QA/QC) come ad esempio:

- definire e concordare i metodi da utilizzare per la determinazione di tutti i parametri
- verificare la validazione del metodo utilizzato dal laboratorio prima dell'inizio della campagna,
- verificare la partecipazione del laboratorio di analisi a circuiti interlaboratorio sui parametri da analizzare,
- definire la sequenza di analisi da utilizzare,
- etichettare i campioni in modo cieco per il laboratorio di analisi,
- inviare un Materiale di Riferimento cieco da utilizzare in ogni sequenza di analisi (campione di QA/QC),
- prevedere, eventualmente, la ripetizione del 10% delle misure dei campioni da parte di un altro laboratorio di fiducia e da eseguire durante la campagna di prove.

Le attività di validazione di ISPRA (Fase 1) sono dettagliate nell'Allegato 2

Attività di validazione (Fase 2)

Nell'ottica di pianificare le misure di QA/QC a monte dell'attività analitica, ERSAF e i suoi collaboratori insieme ad INDAM e ISPRA hanno concordato un disegno sperimentale per la misura di tutti gli analiti investigati sia per i campioni di controllo che dei trattamenti di biorimedio per il tempo di campionamento t0 e t4, per un totale di 74 misure indipendenti su terreno e 54 misure inidpendenti su biomasse vegetali. I campioni del t0 dovevano essere necessariamente ripetuti per poter confrontare i dati di t4 a t0 ottenuti nelle stesse condizioni. In tale riunione, avvenuta a Gennaio 2018, sono state infatti prese le seguenti decisioni:

1. Utilizzo di Materiali di riferimento in cieco forniti da ISPRA da parte del laboratorio durante tutte le analisi. In ogni batch analitico devono essere analizzati al massimo 10 campioni di biorimedio (per ognuna delle matrici) ed un campione di CRM. I CRM sono stati denominati come segue :
    a. ISPRA-ERSAF "metalli suolo"
    b. ISPRA-ERSAF "metalli vegetali"da usare per le matrici epigea dei vegetali;
    c. ISPRA-ERSAF "PCB" da usare per le matrici suolo e radici;
    d. ISPRA-ERSAF "diossine" da usare per le matrici suolo e radici.

2. Ogni batch analitico di misura deve essere strutturato secondo la seguente sequenza:
    a. 1 bianco procedurale;
    b. 1 bianco solventi;
    c. 1 controllo della taratura;
    d. 1 CRM;
    e. 10 campioni;
    f. 1 bianco solventi.

3. Gli strumenti devono essere regolati (tune) almeno una volta al giorno
4. Tutti i campioni saranno consegnati a INDAM con etichettatura cieca e randomizzata.
5. INDAM Laboratori S.r.l, tramite ERSAF, invierà tutte le informazioni necessarie richieste da ISPRA per la validazione dei nuovi risultati.
6. La ripetizione del 10 % delle misure da parte di un laboratorio terzo di fiducia non risulta in questo caso perseguibile perché questa comporterebbe un numero di misure statisticamente non significativo, cioè 5/7 misure ripetute.

Contestualmente allo svolgimento delle misure svolte sui campioni ERSAF, le misure su materiali di riferimento certificati (CRM), forniti in forma incognita da ISPRA, sono state condotte inserendo una porzione di prova di ciascun materiale all'interno della sequenza analitica pertinente. Il laboratorio ha utilizzato per tali materiali, pertanto, le medesime procedure di misurazione adottate per i campioni reali prelevati ed oggetto del processo di validazione. Le caratteristiche e i parametri dei materiali di riferimento certificati forniti in cieco da ISPRA ad INDAM sono riassunte nelle seguenti tabelle (in allegato sono riportati i certificati dei Materiali di Riferimento - Allegato 5):

Tabella 3- Caratteristiche dei materiali di riferimento per il controllo di qualità

Denominazione	Matrice	Parametri
ERM- CC141	Suolo argilloso	As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn
BCR 529	Suolo industriale	2,3,7,8 TCDD, 1,2,3,7,8 PCDD 1,2,3,4,7,8 HxCDD, 1,2,3,6,7,8 HxCDD, 1,2,3,7,8,9 HxCDD, 2,3,4,7,8 PCDF, 1,2,3,4,7,8 HxCDF, 1,2,3,6,7,8 HxCDF, 1,2,3,4,7,8,9 HpCDF, 2,3,4,6,7,8 HxCDF
ERM-CD281	Loglio	As, B, Cd, Mo, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn; Sb, Se; Sn
BCR 481	Suolo Industriale	PCB 101, PCB 118, PCB 128, PCB 101 PCB 149, PCB 101 PCB 153, PCB 156, PCB 170, PCB 180

Inoltre INDAM ha informato ISPRA ed ERSAF di aver partecipato nel corso del 2017 al circuito(IC) INTERCIND 2017SE per la misura dei seguenti analiti:

- metalli in tracce, per le misure di As e Hg i valori rispettivi di z-score sono stati rispettivamente 1.11 e -1.12 (report IC INDAM Allegato 6),
- PCBdl (Policlorobifenili diossina simile) e PCB 28,52,101,138, 153, 180 registrando valori di Zscore in generale inferiore di 1 o poco superiori, (report IC Indam Allegato 7)
- PCDDFs registrando valori di z-score in generale inferiore a 1 o poco superiori (report IC INDAM Allegato 8).

Una volta ricevuti i risultati delle misure dei campioni (trattamenti e controlli) delle diverse matrici per i tempi t0 e t4 questi sono stati elaborati. In particolare per i dati relativi ai campioni di CRM in cieco per i PCDD/F sono stati calcolati i valori di indice di compatibilità (En). Gli En così calcolati, sono risultati generalmente sempre compresi nell'intervallo (-1 e 1), pertanto è stato possibile considerare le misure eseguite da INDAM, fino a quel punto, attendibili.
Il disegno sperimentale proposto con i campioni di QA/QC è risultato idoneo allo scopo. A questo punto è stato dato mandato a INDAM di ripetere tutte le misure (per tutte le classi di parametri) per tutti i campioni del tempo di campionamento t2.
Terminate le analisi relative al t2 sono stati elaborati i risultati, in particolare, dei campioni dei CRM eseguiti contemporaneamente ai campioni della sperimentazione per i tre tempi di campionamento (t0,t2,t4), servendosi di nuovo del calcolo dell'indice di compatibilità En. Le osservazioni scaturite da questa elaborazione sono state discusse da ISPRA con INDAM ed ERSAF in una riunione di chiusura delle attività a novembre 2018 (Allegato 9).
Inoltre la valutazione della qualità delle misure (fare riferimento al paragrafo Risultati) è stata svolta con riferimento al seguente criterio, in accordo al documento "Criteri di validazione dei dati analitici da parte degli enti di controllo – Applicazione del D.M. 471/99" inviato da ISPRA (ex-APAT) al Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio (23/06/2004, prot. 22131):

- elementi in tracce (metalli): ±20% del valore di riferimento del CRM/RM;
- composti organici (PCDDF, PCB,): ±50% del valore di riferimento del CRM/RM.

Infine sono stati messi a confronto i risultati delle misure di PCDD/F e PCB nei campioni di biorimedio condotte nel 2016 e 2018 per i tempi di campionamento t0 e t2, come anche la ripetibilità di tali misure in termine di CV% (coefficiente di variazione percentuale) applicando l'analisi della varianza ANOVA.
I punti di confronto sviluppati durante la riunione e le conclusioni raggiunte a seguito delle diverse elaborazioni sono sintetizzati nel paragrafo Conclusioni.
Gli allegati 9 e 10 dettagliano le attività di convalida di ISPRA della fase 2.

Metodi di analisi utilizzati da INDAM per i parametri PCB, PCDD/F e metalli nelle biomasse vegetali e nei suoli

Anche per i campioni di suolo di biorimedio di questa seconda fase la preparazione dell'aliquota di prova di tale matrice è avvenuta mediante il metodo JLC (Japanese slab cake).
La procedura di misura per la determinazione di PCB e PCDD/F sia in campioni di terreno che di materiale vegetale fa riferimento rispettivamente al Metodo EPA 1668C "Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids and Tissue by HRGC/HRMS" e al Metodo 1613B (1994) Tetra-Through Octa-Chlorinated Dioxin and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS Thermo Scientific TRACE GC ULTRA accoppiato allo spettrometro di massa Thermo Scientific DFS.

Per entrambe le matrici l'estrazione è condotta mediante tecnica PFE (Pressurized Fluid extraction), avvalendosi chiaramente di due metodi/ condizioni operative diversi. La fase di purificazione prevede per la matrice materiale vegetale uno step in GPC a cui ne segue uno comune alle due matrici (cromatografia su colonna) consueto per questi tipi di misurandi. Prima della fase di estrazione, di quella di purificazione e dell'iniezione strumentale sono aggiunti gli standard interni labellati (13C) di PCB e PCDDF in quantità in massa come da metodi EPA (metodi in diluizione isotopica).
La determinazione strumentale su massa magnetica è stata condotta utilizzando le condizioni operative come da metodi.
Indam ha calcolato il limiti di quantificazione mediante il punto più basso della retta di taratura. I LOQ così calcolati sono stati verificati da ISPRA (Allegato 10).

Nella relazione tecnica fornita da INDAM sulla procedura di misura delle sostanze sopra indicate sono descritte esclusivamente le modalità operative della procedura.
Il laboratorio ha fornito poi lo studio di precisione condotto in condizioni di ripetibilità ristretta per la misura di PCB e di PCDD/F in terreni e sedimenti. Sono state considerate 10 misure indipendenti di un terreno contaminato. Nello studio di precisione condotto è stata valutata la presenza di dati anomali mediante il test di Dixon anche se poi i valori anomali registrati per i PCB non sono stati esclusi per non rischiare di sottostimare i coefficienti di variazione corrispondenti.
I dati di riproducibilità dichiarati (modulo 107 A4- riferimento procedura PG 107 del 7/6/2017) evidenziano, per la misura di PCB, un CV% compreso in un intervallo tra 2 e oltre il 50%; intervallo che risulta similare a quello riportato per la misura dei PCB nei campioni ripetuti nel 2018 e mediamente più alto di quelli analizzati nel 2016.
I dati di ripetibilità dichiarati (modulo 107 A4- riferimento procedura PG 107 del31/5/2017) evidenziano per la misura di PCDD/F un CV% compreso in un intervallo tra 3 e oltre il 20%; intervallo che risulta similare a quello riportato per la misura dei PCDD/F nei campioni ERSAF ripetuti nel 2018 con una variabilità leggermente maggiore rispetto a quelli analizzati nel 2016, ma non particolarmente più alta.

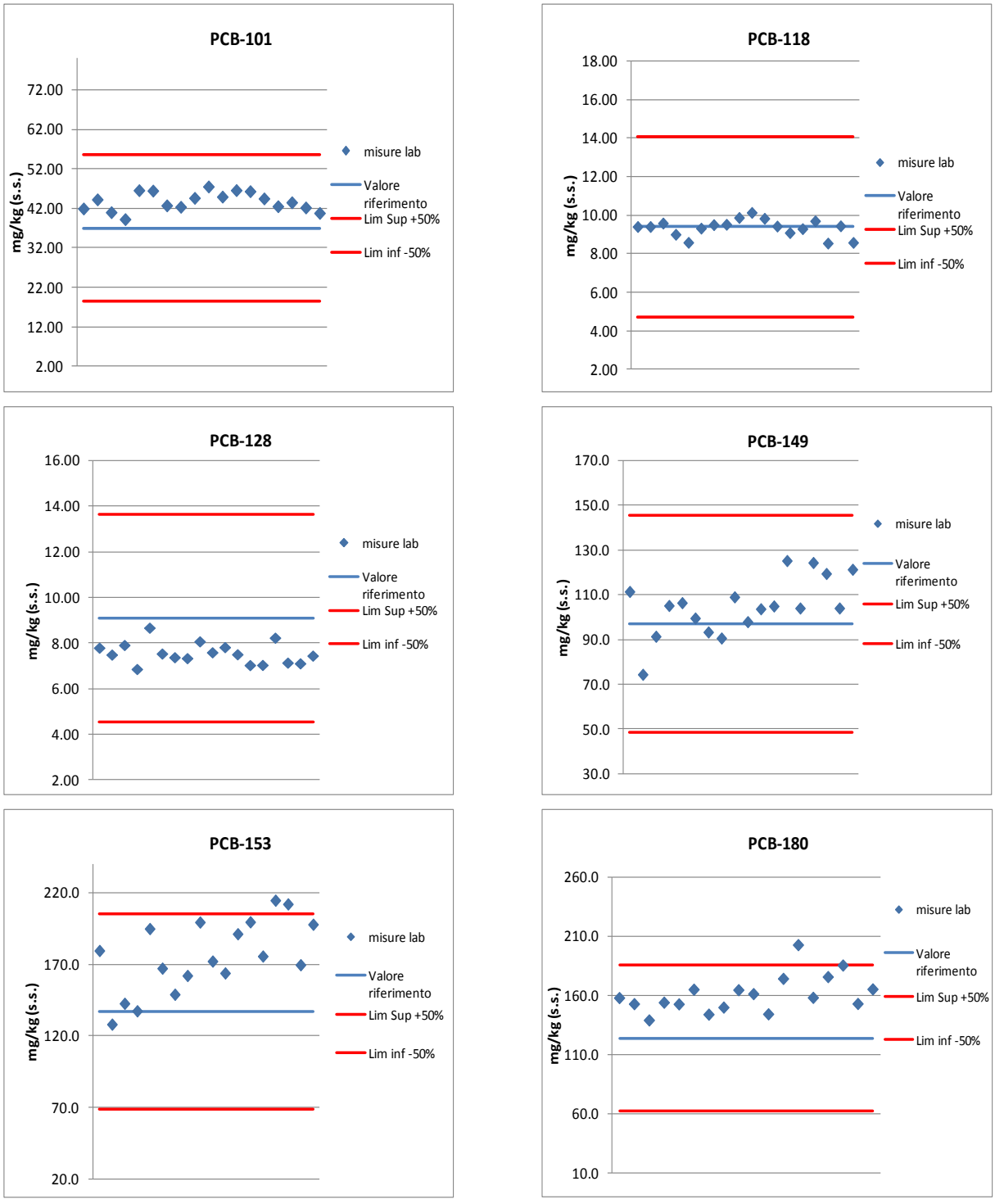
La procedura impiegata per la determinazione dei metalli nei campioni di terreno fa riferimento al metodo DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200.8 1994, che prevede la mineralizzazione di circa 1 grammo di terreno con la miscela di 9 ml HCL (≥ 37%, puriss. p.a.), 3 ml HNO_3 (≥ 65%, puriss. p.a.), 1 ml H_2O_2 (≥ 30%, traceSELECT ULTRA) e dosaggio dopo opportuna diluizione in ICP-MS (Agilent 7500CE).
I campioni nei quali è rilevata una bassa concentrazione di mercurio sono analizzati con tecnica più sensibile e strumento dedicato (Milestone DMA-80) basato su decomposizione termica del campione, accumulo su amalgama e determinazione finale in assorbimento atomico secondo la metodica EPA 7473 2007.
Il metodo per la determinazione dei metalli è accreditato UNI CEI EN ISO IEC 17025.

La procedura impiegata per la determinazione dei metalli nei campioni di vegetali fa riferimento al metodo UNI EN 13804: 2013 + UNI EN 13805: 2014 + UNI EN 15763: 2010 che prevede la mineralizzazione in microonde Milestone UltraWAVE di circa 1 grammo di campione con la miscela di 3 ml HNO_3 (≥ 65%, puriss. p.a.), 1 ml H_2O_2 (≥ 30%, traceSELECT ULTRA).
I campioni mineralizzati, dopo opportuna diluizione, sono analizzati in ICP-MS (Agilent 7500CE).
I campioni nei quali è rilevata una bassa concentrazione di mercurio sono analizzati tal quali con tecnica più sensibile e strumento dedicato (Milestone DMA-80) basato su decomposizione termica del campione, accumulo su amalgama e determinazione finale in assorbimento atomico secondo la metodica EPA 7473 2007.

Risultati

Di seguito sono riportate le elaborazioni secondo quanto già descritto nella relazione sulla Fase 1, rispetto al coefficiente En e al documento "Criteri di validazione dei dati analitici da parte degli enti di controllo – Applicazione del D.M. 471/99"esemplificati con grafici ottenuti per i PCB sul BCR 481 e tabelle che riportano le valutazioni per PCDD/F e metalli nelle diverse matrici.

Figura 7- PCB nella misura dei campioni di QA/QC (BCR 481)



Segue Figura 7- PCB nella misura dei campioni di QA/QC

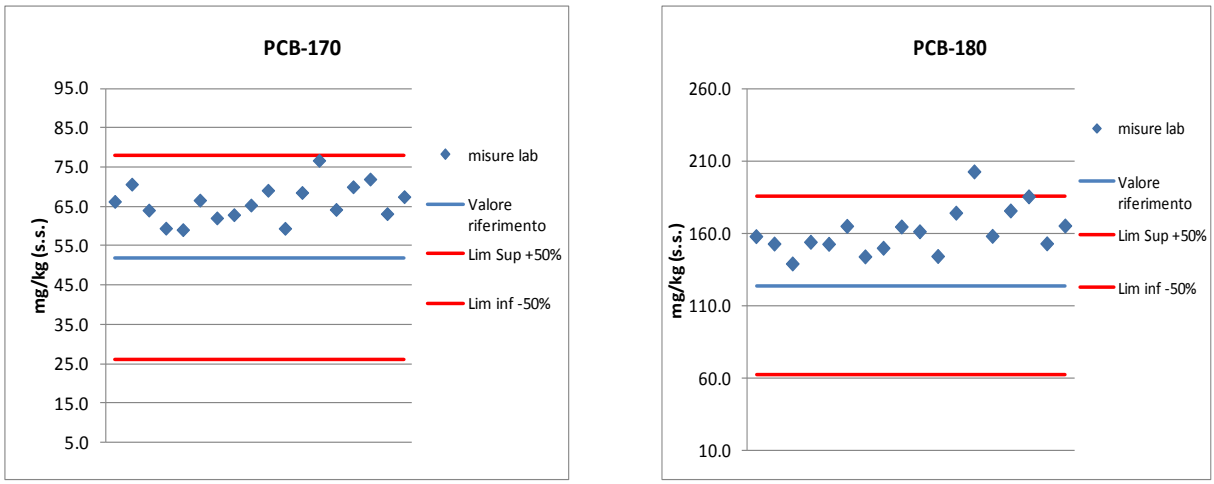


Tabella 4- Valutazione del criterio del 50% sul CRM (BCR 529) per le PCDDF

BCR 529	matrice campione	Esito 2,3,7,8TCDD	Esito 1,2,3,7,8 PCDD	Esito 1,2,3,4,7,8 HxCDD	Esito 1,2,3,6,7,8 HxCDD	Esito 1,2,3,7,8,9 HxCDD
CRM_1	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_2	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_3	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_4	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_5	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_6	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_7	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_8	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_9	radici	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_10	radici	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_11	radici	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_12	radici	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_13	radici	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_14	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_15	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_16	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_17	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_18	terreno	OK	OK	OK	OK	OK

BCR 529	matrice campione	Esito 2,3,7,8 TCDF	Esito 1,2,3,7,8 PeCDF	Esito 2,3,4,7,8 PeCDF	Esito 1,2,3,4,7,8 HxCDF	Esito 1,2,3,6,7,8 HxCDF	Esito 1,2,3,7,8,9 HxCDF	Esito 2,3,4,6,7,8 HxCDF
CRM_1	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_2	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_3	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_4	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_5	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	OK
CRM_6	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	OK
CRM_7	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_8	terreno	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK

CRM_9	radici	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_10	radici	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_11	radici	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	OK
CRM_12	radici	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	OK
CRM_13	radici	OK	OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_14	terreno	OK	NON OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_15	terreno	OK	NON OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_16	terreno	OK	NON OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_17	terreno	OK	NON OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK
CRM_18	terreno	OK	NON OK	OK	OK	OK	NON OK	NON OK

Tabella 5- Valori En per le PCDD/F

BCR 529	matrice campione	En 2,3,7,8TCDD	En 1,2,3,7,8 PCDD	En 1,2,3,4,7,8 HxCDD	En 1,2,3,6,7,8 HxCDD	En 1,2,3,7,8,9 HxCDD
CRM_1	terreno	-0,13	0,30	0,25	0,10	0,13
CRM_2	terreno	0,08	0,42	0,36	0,17	0,21
CRM_3	terreno	0,01	0,29	0,19	0,02	0,06
CRM_4	terreno	-0,05	0,30	0,28	0,17	0,20
CRM_5	terreno	-0,16	0,29	0,12	-0,06	-0,11
CRM_6	terreno	-0,13	0,26	0,09	-0,05	-0,07
CRM_7	terreno	0,14	0,39	0,33	0,22	0,12
CRM_8(*)	terreno	0,07	0,26	0,35	0,07	0,04
CRM_14	terreno	0,31	0,90	0,69	0,56	0,83
CRM_15	terreno	0,30	0,76	0,48	0,41	0,78
CRM_16	terreno	0,41	0,85	0,69	0,65	1,07
CRM_17	terreno	0,40	0,68	0,63	0,59	0,98
CRM_18	terreno	0,29	0,87	0,66	0,61	0,88

(*) I valori dei CRM

Tabella 6- Valutazione del criterio del 20% sul CRM (ERM-CC141) per i metalli

ERM-CC141	matrice campione	Esito Arsenico	Esito Mercurio	Esito Piombo	Esito Rame	Esito Zinco
CRM_1	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_2	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_3	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_4	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_5	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_6	terreno	OK	OK	OK	OK	OK
CRM_7	radici	OK	OK	NON OK	OK	NON OK
CRM_8	radici	OK	-	NON OK	OK	NON OK
CRM_9	radici	OK	-	NON OK	OK	NON OK
CRM_10	radici	OK	-	NON OK	OK	NON OK
CRM_11	radici	OK	-	NON OK	OK	NON OK

Tabella 7- Valutazione del criterio del 20% sul CRM (ERM-CD281) per i metalli

ERM-CD281	Esito Arsenico	Esito Mercurio	Esito Piombo	Esito Rame	Esito Zinco
CRM_1	n.a.*	OK	OK	OK	OK
CRM_2	n.a.*	-	OK	OK	OK
CRM_3	n.a.*	-	OK	OK	OK
CRM_4	n.a.*	OK	OK	OK	OK
CRM_5	n.a.*	-	OK	OK	OK

* la misura sperimentale è risultata <LOQ del laboratorio

Confronto delle frazioni in massa di PCDD/F negli anni 2016 e 2018 per il t0

I risultati delle analisi dei campioni di biorimedio al tempo t0 sono state condotte sui congeneri elencati in tabella 8 e sono riportati nell'Allegato 11.

Tabella 8- Diossine e furani misurate nei campioni di biorimedio ed ordine dei congeneri nei singoli grafici presenti negli allegati 11 e 13

DIOSSINE E FURANI	
1	2,3,7,8 TCDD
2	1,2,3,7,8 PCDD
3	1,2,3,4,7,8 HxCDD
4	1,2,3,7,8,9 HxCDD
5	1,2,3,6,7,8 HxCDD
6	1,2,3,4,6,7,8 HpCDD
7	OCDD
8	2,3,7,8 TCDF
9	2,3,4,7,8 PCDF
10	1,2,3,7,8 PCDF
11	1,2,3,4,7,8 HxCDF
12	1,2,3,7,8,9 HxCDF
13	1,2,3,6,7,8 HxCDF
14	2,3,4,6,7,8 HxCDF
15	1,2,3,4,6,7,8 HpCDF
16	1,2,3,4,7,8,9 HpCDF
17	OCDF

Si possono notare alcune differenze nelle frazioni in massa trovate nelle analisi condotte nel 2016 rispetto a quelle ottenute nel 2018. Queste differenze hanno suggerito di rianalizzare tutti i campioni nel 2018 per poter procedere al confronto tra le concentrazioni nei diversi periodi di trattamento.

Confronto del CV% di PCDD/F 2016 e 2018

Per verificare le perplessità evidenziate sui primi dati delle analisi eseguite da INDAM nel 2016 relativamente al la bassa variabilità dei dati tra le repliche, è stata condotto, tramite ANOVA, il

confronto tra i Coefficienti di Variazione percentuale (CV%) calcolati dalla media dei risultati delle analisi di PCDD/F dei 3 campioni per ogni tipologia di esperimento per gli anni 2016 e 2018. Per i risultati dei PCDD/F, i CV% dei campioni C1, C3,C5, C7 possono essere considerati appartenenti allo stesso gruppo in quanto F (variabile casuale F di Fisher-Snedecor) è inferiore a F critico; mentre i CV% dei campioni C2, C4, C6 devono essere considerati due gruppi diversi poiché il valore di F è superiore a F critico.

Confronto delle frazioni in massa di PCB negli anni 2016 e 2018 a t0

I risultati delle analisi dei campioni di biorimedio al tempo t0 sono state condotte sui congeneri e le somme elencate nella tabella 9, l'Allegato 12 riporta i grafici di confronto nei due anni delle misure di PCB al tempo t0. I picchi principali dei grafici riportati nell'Allegato 12 sono le somme dei congeneri con lo stesso numero di atomi cloro sostituti.

Tabella 9- PCB misurati nei campioni di biorimedio ed ordine dei congeneri nei singoli grafici presenti negli allegati 12 e 14

POLICLOBIFENILI	
1	PCB 1 (MonoCB)
2	PCB 3 (MonoCB)
3	MonoCB - Somma
4	PCB 4 (DiCB)
5	PCB 6 (DiCB)
6	PCB 8 (DiCB)
7	PCB 10 (DiCB)
8	PCB 15 (DiCB)
9	DiCB - Somma
10	PCB 16 (TriCB)
11	PCB 18 (TriCB)
12	PCB 19 (TriCB)
13	PCB 22 (TriCB)
14	PCB 28 (TriCB)
15	PCB 31 (TriCB)
16	PCB 33 (TriCB)
17	PCB 37 (TriCB)
18	TriCB - Somma
19	PCB 40 (TetraCB)
20	PCB 41 (TetraCB)
21	PCB 44 (TetraCB)
22	PCB 49 (TetraCB)
23	PCB 52 (TetraCB)
24	PCB 54 (TetraCB)
25	PCB 60 (TetraCB)
26	PCB 66 (TetraCB)
27	PCB 70 (TetraCB)
28	PCB 74 (TetraCB)

29	PCB 77 (TetraCB)
30	PCB 81 (TetraCB)
31	TetraCB - Somma
32	PCB 84 (PentaCB)
33	PCB 85 (PentaCB)
34	PCB 87 (PentaCB)
35	PCB 90+101 (PentaCB)
36	PCB 95 (PentaCB)
37	PCB 97 (PentaCB)
38	PCB 99 (Penta CB)
39	PCB 104 (PentaCB)
40	PCB 105 (PentaCB)
41	PCB 110 (PentaCB)
42	PCB 114 (PentaCB)
43	PCB 118 (PentaCB)
44	PCB 119 (PentaCB)
45	PCB 123 (PentaCB)
46	PCB 126 (PentaCB)
47	PentaCB - Somma
48	PCB 128 (EsaCB)
49	PCB 129 (EsaCB)
50	PCB 137 (EsaCB)
51	PCB 138 (EsaCB)
52	PCB 141 (EsaCB)
53	PCB 146 (EsaCB)
54	PCB 149 (EsaCB)
55	PCB 151 (EsaCB)
56	PCB 153+168 (EsaCB)
57	PCB 156 (EsaCB)
58	PCB 157 (EsaCB)
59	PCB 158 (EsaCB)
60	PCB 167 (EsaCB)
61	PCB 169 (EsaCB)
62	EsaCB - Somma
63	PCB 170 (EptaCB)
64	PCB 171 (EptaCB)
65	PCB 177 (EptaCB)
66	PCB 180 (EptaCB)
67	PCB 183 (EptaCB)
68	PCB 187 (EptaCB)
69	PCB 189 (EptaCB)
70	PCB 191 (EptaCB)
71	PCB 193 (EptaCB)
72	EptaCB - Somma
73	PCB 194 (OctaCB)

74	PCB 196+203 (OctaCB)
75	PCB 199 (OctaCB)
76	PCB 200 (OctaCB)
77	PCB 201 (OctaCB)
78	PCB 202 (OctaCB)
79	PCB 205 (OctaCB)
80	OctaCB - Somma
81	PCB 206 (NonaCB)
82	PCB 207 (NonaCB)
83	PCB 208 (NonaCB)
84	NonaCB - Somma
85	PCB 209 (DecaCB)
86	DecaCB - Somma

Anche per questi analiti è stata riscontrata una differenza tra i risultati ottenuti nel 2016 e quelli del 2018 confermando la necessità della ripetizione ripetizione dell'analisi di tutti i campioni per poter procedere ai confronti necessari a mettere in evidenza gli effetti della sperimentazione.

Confronto del CV% 2016 e 2018di PCB a t0

Per verificare le perplessità evidenziate sui primi dati delle analisi eseguite da INDAM nel 2016relativamente al la bassa variabilità dei dati tra le repliche, è stata condotto, tramite ANOVA, il confronto tra i Coefficienti di Variazione percentuale (CV%) calcolati dalla media dei risultati delle analisi di PCDD/F dei 3 campioni per ogni tipologia di esperimento per gli anni 2016 e 2018. I CV% dei campioni C1, C3,C4,C5,C6 e C7 devono essere considerati due gruppi diversi in quanto il valore di F è superiore a F critico, mentre per il campione C2 i risultati del 2016 possono essere considerati appartenenti allo stesso gruppo dei risultati del 2018 in quanto F è inferiore a F critico.

Confronto delle frazioni in massa di PCDD/F negli anni 2016 e 2018 a t2

Anche per i risultati dell'analisi dei campioni al tempo t2 è stata verificata una differenza nei risultati ottenuti per i composti PCDD/F nel 2016 e nel 2018. Ciò ha ulteriormente avvalorato la necessità della richiesta della ripetizione di tutte le analisi dei campioni nel 2018 da eseguire secondo i criteri di assicurazione di qualità indicati da ISPRA.

Confronto del CV% 2016 e 2018 di PCDD7F a t2

Per verificare le perplessità evidenziate sui primi dati delle analisi eseguite da INDAM nel 2016 relativamente alla bassa variabilità dei dati tra le repliche, è stata condotto, tramite ANOVA, il confronto tra i Coefficienti di Variazione percentuale (CV%) calcolati dalla media dei risultati delle analisi di PCDD/F dei 3 campioni per ogni tipologia di esperimento per gli anni 2016 e 2018. I CV% dei campioni C3, P3, P4 e P6 devono essere considerati due gruppi diversi in quanto il valore di F è superiore a F critico, mentre per tutti gli altri campioni i risultati del 2016 possono essere considerati appartenenti allo stesso gruppo dei risultati del 2018 in quanto F è inferiore a F critico.

Confronto delle frazioni in massa di PCB negli anni 2016 e 2018 a t2

Si riconferma anche per i PCB una differenza tra i risultati ottenuti nel 2016 e quelli ottenuti nel 2018.

Confronto del CV% dei risultati della analisi dei PCB eseguite nel 2016 e 2018

Per verificare le perplessità evidenziate sui primi dati delle analisi eseguite da INDAM nel 2016 relativamente alla bassa variabilità dei dati tra le repliche, è stata condotto, tramite ANOVA, il confronto tra i Coefficienti di Variazione percentuale (CV%) calcolati dalla media dei risultati delle analisi di PCDD/F dei 3 campioni per ogni tipologia di esperimento per gli anni 2016 e 2018. I CV% dei campioni C3, C7, P1, P2, P5, P6 e P10 devono essere considerati due gruppi diversi in quanto il valore di F è superiore a F critico, mentre per gli altri campioni i risultati del 2016 possono essere considerati appartenenti allo stesso gruppo dei risultati del 2018 in quanto F è inferiore a F critico.

Conclusioni

Di seguito sono riportate le principaliconclusioni sulla validazione dei risultati prodotti da INDAM Laboratori srl sia sui CRM analizzati in cieco che sui risultati dei campioni derivanti dalla sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra del SIN Brescia-Caffaro.

1. I risultati ottenuti dal laboratorio di analisi sui materiali di riferimento analizzati "in cieco"(CRM), per i misurandi oggetto della sperimentazione, soddisfano in generale i criteri riportati nel documento "Criteri di validazione dei dati analitici da parte degli enti di controllo – Applicazione del D.M. 471/99" inviato da ISPRA al Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio (23/06/2004, prot. 22131) e nella norma ISO 13528:2015 (En).
2. Si riscontrano En superiore ad 1 (da considerare non accettabile) nei congeneri 1,2,3,7,8,9 HxCDF e 2,3,4,6,7,8 HxCDF nei campioni di QA/QC. Analizzando i cromatogrammi, per quanto riguarda il congenere 1,2,3,7,8,9 HxCDF non si riscontra una possibile interferenza; mentre per 2,3,4,6,7,8 HxCDF sembra probabile la coeluizione con un altro congenere che, da letteratura, potrebbe essere il congenere 1,2,3,4,8,9 HXCDF. Tale interferente 2,3,4,6,7,8 HxCDF non è evidente nei campioni di biorimedio.
3. Per verificare le perplessità evidenziate sui primi dati delle analisi eseguite da INDAM (tempi di campionamento t0 e t2) relativamente alla bassa variabilità dei dati tra le repliche, è stato condotto, tramite ANOVA, il confronto tra i Coefficienti di Variazione percentuale (CV%) calcolati dalla media dei risultati delle analisi di PCDD/F dei 3 campioni per ogni tipologia di esperimento per gli anni 2016 e 2018. Questo tipo di analisi statistica ha messo in evidenza che per i campioni di PCB questa ripetibilità risulta sostanzialmente diversa tra i dati del 2016 rispetto a quelli del 2018; inoltre rispetto allo studio di ripetibilità condotto da INDAM sui campioni ERSAF il CV% risulta compreso in un intervallo tra 2 e oltre il 50%; intervallo che risulta similare a quello riportato per la misura dei PCB nei campioni ripetuti nel 2018 e mediamente più alto di quelli analizzati nel 2016.
4. Con lo stesso tipo di analisi statistica, per le PCDD/F questa differenza di ripetibilità tra i due anni non è risultata così evidente.
5. La differenza tra le frazioni in massa ottenute nel 2016 rispetto a quelle ottenute nel 2018 ha ulteriormente avvalorato la necessità di rianalizzare tutti i campioni nel 2018 (come

fatto) per poter procedere alle analisi di confronto tra i diversi periodi di trattamento nelle condizioni di assicurazione di qualità come richieste da ISPRA.

6. I campioni analizzati nel 2016 erano stati inviati ad INDAM Laboratori con i codici in chiaro della sperimentazione. Il laboratorio incaricato, aveva così eseguito le tre repliche dei singoli campioni in condizioni di ripetibilità ristretta. Questa condizione, insieme ad una valutazione della granulometria molto omogenea dei campioni, potrebbe spiegare il basso coefficiente di variazione percentuale trovato nei risultati del 2016.

Sulla base delle considerazioni soprariportate si possono pertanto ritenere validi i risultati analitici prodotti nell'anno 2018 da INDAM Laboratori srl per tutti i parametri analizzati.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZA E ALTA TECNOLOGIA - DiSAT

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE PER GLI ALIMENTI LA NUTRIZIONE, L'AMBIENTE -DEFENS

OGGETTO: Relazione Tecnico – Scientifica - Problematiche riscontrate nel processo di valutazione dei dati di analisi del suolo, forniti da Indam Laboratori S.r.l, ottenuti nell'ambito delle sperimentazioni in serra di tecniche di biorimedio.

Introduzione

La presente relazione, è finalizzata ad evidenziare le problematiche riscontrate sui dati ricevuti dall'azienda che ha eseguito le analisi dei contaminanti nei campioni provenienti degli esperimenti in vaso condotti negli anni 2015-2016. Tale sperimentazione è necessariamente preliminare al biorimedio dei suoli delle aree agricole del SIN Brescia – Caffaro, essendo finalizzata alla selezione delle specie vegetali più idonee per essere piantumate nell'area, in grado di stimolare i processi degradativi a carico degli inquinanti. Per questo motivo l'ottenimento di dati scientificamente attendibili di analisi del suolo e delle biomasse vegetali è fondamentale per la predisposizione delle attività future, quali l'ottenimento dei valori di concentrazione dei campioni di suoli e biomasse dei tempi successivi e la predisposizione delle linee guida del progetto di bonifica.

L'esecuzione della prestazione contrattuale in capo all'Università degli Studi dell'Insubria e all'Università degli Studi di Milano, in termini di correttezza della medesima, presuppone, in via assoluta, l'attendibilità e l'accettabilità sotto il profilo scientifico dei dati. In mancanza di tali condizioni, l'attività commissionata da ERSAF, risulta né proseguibile, né realizzabile, nei termini contrattualmente pattuiti.

Oggetto della collaborazione scientifica

ERSAF è stata incaricata da Regione Lombardia (lettera di incarico n. 17688/RCC del 14 marzo 2013) della "Realizzazione delle attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e

progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole nel Sito di Interesse Nazionale di Brescia – Caffaro, come definite all'art. 3, punto E del relativo Accordo di Programma".

In seguito a tale incarico ERSAF ha stipulato accordi di collaborazione con il Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia (DSAT) dell'Università degli Studi dell'Insubria e con il Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS) dell'Università degli Studi di Milano per la collaborazione tecnico-scientifica finalizzata al biorimedio dei terreni delle aree agricole del SIN Brescia-Caffaro e loro successiva bonifica. Il DSAT e il DeFENS ed ERSAF hanno istituito una cooperazione scientifica finalizzata alla comune realizzazione delle attività di ricerca e sperimentali necessarie a fornire idonei supporti di conoscenze sui temi del destino ambientale dei contaminanti e della microbiologia ambientale nel SIN Brescia-Caffaro. Come recita l'accordo di collaborazione, la cooperazione è funzionale alla definizione di una metodologia finalizzata alla sperimentazione di tecniche di biorimedio nei terreni agricoli del SIN e alla progettazione della loro bonifica mediante estensione delle tecniche risultate migliori per i fini proposti. Il DSAT si avvale inoltre della collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Chimica Materiali Ambiente (DICMA) di Sapienza Università di Roma (per le competenze di carattere geostatistico e di analisi spaziale).

ATTIVITÀ SVOLTE FINORA DAL GRUPPO DI LAVORO (GdL)

1) Attività di caratterizzazione della contaminazione

Durante i primi due anni di collaborazione sono stati predisposti i protocolli per la valutazione spaziale della contaminazione in tre aree agricole rappresentative del SIN Brescia – Caffaro. Sono state in particolare definite tre fasi:

- **Fase 1**: valutazione qualitativa dei contaminanti: tale fase ha permesso di ottenere un elenco aggiornato dei contaminanti presenti nei suoli a livello di congeneri: policlorobifenili (PCB), policlorodibenzodiossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF) oltre che dei metalli presenti (mercurio, arsenico, cromo ecc.)
- **Fase 2**: ricostruzione della distribuzione verticale dei contaminanti con la profondità (0-1 m) È stato possibile ricostruire il gradiente verticale in diversi punti nelle tre aree e valutare le profondità raggiunte dai contaminanti, maggiormente concentrati nei primi 40 cm di suolo (Figura 1 mostra come esempio la distribuzione di alcune classi di congeneri di PCB)
- **Fase 3**: mappatura della concentrazione degli inquinanti nei primi 40 cm di suolo nelle tre aree in esame. (Figura 2 mostra la distribuzione dei PCB totali nel campo Antonioli come esempio)

La disponibilità di informazioni sulla distribuzione dei contaminanti sul piano verticale (fase 2) ed orizzontale (fase 3) ha permesso di ottenere le informazioni necessarie per la ricostruzione tridimensionale della contaminazione. In particolare è stato osservato che le aree presentano anche un forte gradiente orizzontale, ovvero le aree più contaminate, sono generalmente quelle in prossimità di punti di ingresso di acqua di irrigazione per scorrimento (Figura 2)

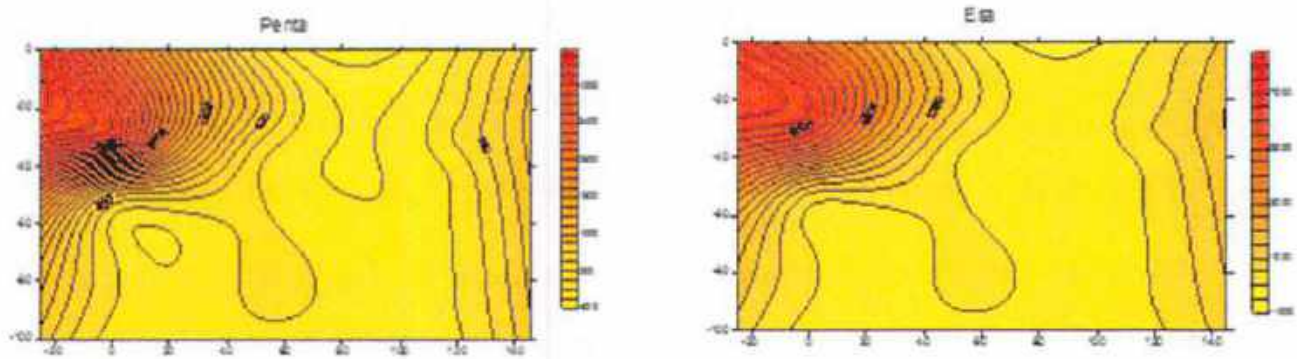


Figura 1 – Gradiente della concentrazione verticale di penta ed esa-PCB nei terreni Antonioli

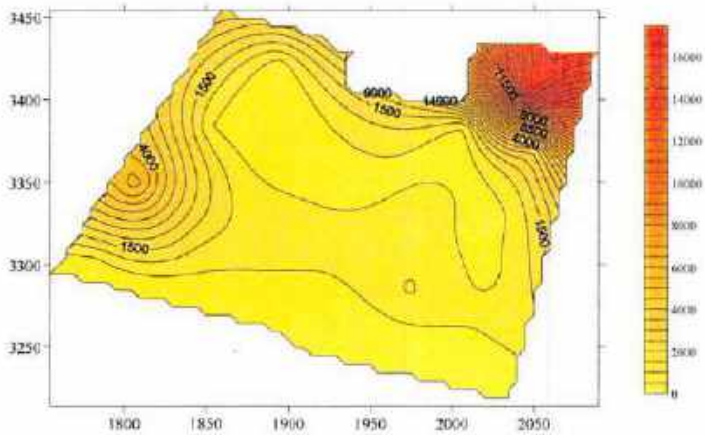


Figura 2 – Mappa della concentrazione di PCB nel campo Antonioli. I valori di concentrazione più elevati (in rosso) si trovano in prossimità del punto di ingresso di acqua di irrigazione.

2) Sperimentazione in serra

2.1) Importanza della sperimentazione in serra nel contesto della progettazione del piano di bonifica

Fra le attività assegnate ai consulenti scientifici del DSATe DeFENS vi sono quelle legate alla predisposizione di protocolli per la sperimentazione in microcosmo (serra) e in parcelle (campo) al fine di determinare le specie vegetali più efficienti e le condizioni più adatte al biorimedio. Tali attività sono definite negli accordi di collaborazione (in particolare negli allegati tecnici) siglati fra ERSAF e, rispettivamente, DiSAT e DeFENS.

L'obiettivo principale della sperimentazione in serra è quello di trovare le specie vegetali più idonee e le condizioni colturali più adatte che stimolino l'attività dei microrganismi autoctoni del suolo di degradazione degli inquinanti organici o la fitoestrazione dei metalli (*rhizoremediation/phytoextraction*). La fase in serra è necessaria e preliminare alla fase in campo in quanto le condizioni di serra consentono di saggiare diverse condizioni contemporaneamente e di controllare molte variabili ambientali importanti nel determinare l'effettivo comportamento degli inquinanti.

Per individuare e valutare l'importanza di tali fattori è stato redatto nel 2015 dai consulenti scientifici di DSAT e DeFENS un documento (**Allegato 1** - Background document per la messa a punto di un protocollo per gli esperimenti di *rhizoremediation/phytoextraction*) derivante da un'accurata ricerca bibliografica.

Come risulta dallo stesso, fra le variabili importanti nel determinare l'efficienza di *rhizoremediation/phytoextraction* vi sono:

- Concentrazione nel suolo delle diverse classi di contaminanti (PCB, PCDD/Fs, metalli) e loro disponibilità
- Specie vegetale impiegata e sua possibile consociazione con altre
- Condizioni idrologiche
- Concimazione minerale e/o organica
- pH
- potenziale redox
- temperatura

Per potere scegliere le specie vegetali e le condizioni colturali più efficienti, occorre saggiarle in identiche condizioni ambientali, così da non avere l'influenza degli altri parametri sopracitati. È dunque fondamentale eseguire gli esperimenti in condizioni controllate (in serra) e disporre di una serie di campioni di controllo. Per eliminare la variabilità indotta da una diversa concentrazione degli inquinanti, è in particolare necessario omogenare il suolo in modo che idealmente i contaminanti abbiano la stessa concentrazione iniziale in tutti i vasi. A tale scopo è stato predisposto un protocollo per l'omogeneizzazione del suolo e la preparazione dei vasi (**Allegato 2** - Protocollo preparazione suolo per esperimenti) e uno per la predisposizione degli esperimenti in serra (**Allegato 3** - Protocollo sperimentazione in serra).

2.2) Trattamenti, controlli e importanza delle repliche

Nel protocollo di sperimentazione in serra (Allegato 3) sono dettagliati i diversi trattamenti (10) saggiati su un suolo campione prelevato dal SIN ed opportunamente omogenizzato (Allegato 2) che corrispondono a 6 specie vegetali selezionate, in diverse combinazioni e condizioni, e i controlli (7). I controlli sono importanti in ogni disegno statistico per verificare che siano i trattamenti (ovvero le specie vegetali) responsabili dell'azione di biorimedio e non il suolo esposto alle varie condizioni sperimentali (es. invasamento, irrigazione, ecc.).

I trattamenti (T) con le diverse specie e consociazioni e controlli (C) predisposti sono mostrati in Tabella 1 e 2. Ogni trattamento/controllo è stato applicato a tre vasi identici (**repliche**) predisposti per ogni tempo di campionamento (5 tempi) nei due anni di sperimentazione. In tabella 3 sono indicati i tempi di campionamento previsti all'inizio della sperimentazione. Ad ogni tempo di campionamento il suolo e la biomassa vegetale sono stati prelevati da ciascuno dei 3 vasi-replica per ogni trattamento (controllo).

Sulla base di questo schema è stato dunque previsto il campionamento di diverse matrici (suolo e materiale vegetale) destinati alle analisi chimiche e microbiologiche. Il campionamento è stato effettuato da ERSAF con modalità predisposte dai consulenti scientifici al fine di minimizzare la variabilità al momento del campionamento, ovvero fornire campioni rappresentativi delle concentrazioni nelle diverse repliche di trattamenti e controlli.

Tabella 1 – Specie impiegate e corrispondenti trattamenti (T)

Specie	*Trattamento*	
Phalaris arundinacea	T1-	solo pianta
	T2-	ciclo redox
Festuca arundinacea	T3	solo pianta
	T4	consociazione con *Cucurbita pepo spp pepo*
	T5-	ciclo redox
	T6	aggiunta compost (DOC producer)
Medicago sativa	T7	micorrize e rizobio
Salix caprea	T8-	consociazione con *Athyrium filix-femina*
Brassica juncea	T9	solo pianta
	T10	aggiunta tiosolfato

Tabella 2 – Controlli adottati nell'esperimento (C)

Controllo	Tipo di controllo
C1	suolo contaminato senza pianta e non fertilizzato
C2:	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato
C3:	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con ciclo redox
C4	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con tiosolfato
C5:	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con aggiunta di compost
C6:	suolo non contaminato con pianta e fertilizzato (*Medicago sativa* + *Festuca arundinacea*)
C7:	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con panetto di terra

Tabella 3 – Tempi di campionamento di suoli e biomassa vegetale per l'analisi chimica e microbiologica

Anno sperimentazione	Tempi di campionamento
Primo	t0: aprile 2015
	t1: luglio 2015
	t2: ottobre 2015
Secondo	t3: luglio 2016
	t4: ottobre 2016

L'esperienza diretta dei consulenti scientifici, in linea con quanto riportato nella letteratura scientifica internazionale, indica che la variabilità intrinseca nella crescita e fisiologia di piante diverse, seppur appartenenti alla stessa specie, è molto elevata. L'analisi del comportamento di una sola pianta potrebbe pertanto risultare molto fuorviante rispetto all'effetto ambientale medio di un campo coltivato con centinaia di individui. Risulta quindi fondamentale analizzare il comportamento di un numero replicato di piante. La predisposizione di almeno tre repliche per ogni trattamento e controllo permette di avere un'indicazione sulla variabilità dei risultati di concentrazione degli inquinanti fra le repliche e quindi potere ottenere valori analizzabili mediante analisi statistiche come ad esempio l'ANOVA. Ciò permette di potere affermare in termini statistici, ovvero scientificamente quantificabili, se uno o più trattamenti differiscono in maniera significativa dai controlli, ovvero permette di determinare se e quali trattamenti siano efficaci o meno. **Solo in questo modo sarà possibile mostrare e giustificare scientificamente le scelte da effettuare sulla/e specie più promettenti da impiegare nella *rhizoremediation/phytoextraction*.** Tali scelte si rifletteranno nella predisposizione delle linee guida del progetto di bonifica e quindi serviranno a giustificare in modo appropriato e scientificamente difendibile l'impiego di fondi pubblici necessari alla bonifica.

2.3) Mandato per analisi chimiche di suoli e biomasse vegetali ed analisi dei risultati ricevuti

ERSAF, coadiuvata dai consulenti per gli aspetti di specifica competenza scientifica, ha predisposto un capitolato per la selezione di un'azienda esterna che potesse effettuare l'analisi di un'ampia selezione di analiti, organici ed inorganici, sui campioni di suolo e biomassa vegetale ottenuti dall'esperimento in serra.

ERSAF ha consegnato i campioni all'azienda aggiudicatrice della gara. Per limitazioni di budget sono stati inviati all'azienda solo i campioni del tempo iniziale (t0) e dopo 7 mesi di sperimentazione in serra (t2). I rimanenti campioni sono stati adeguatamente conservati da ERSAF per eventuale analisi successiva a supporto dei trattamenti più promettenti.

Un'aliquota di ciascun campione è stata inoltre prelevata e preservata per le analisi microbiologiche volte a determinate quali trattamenti hanno indotto una stimolazione dei microrganismi autoctoni del suolo. Tali analisi sono in fase di attuazione presso i laboratori del DeFENS ed i risultati saranno a supporto di quelli di rimozione dei contaminanti.

Il giorno 11 marzo 2016 i consulenti scientifici ricevono da ERSAF i dati chimici prodotti dall'azienda aggiudicatrice della gara. I dati sono stati analizzati dai consulenti scientifici e discussi in diverse riunioni collegiali con ERSAF (Gruppo di lavoro, GdL). Di seguito vengono riportate le considerazioni portate dai consulenti in ciascuna riunione, supportate dall'analisi dei risultati e dal confronto con i dati di letteratura.

PROBLEMATICHE RISCONTRATE NELLA VALUTAZIONE DEI DATI DI ANALISI DEL SUOLO, RIPORTATE NEGLI ULTIMI TRE INCONTRI DEL GdL

1) **GdL del 20 aprile 2016: prime valutazioni dei dati di concentrazione dei campioni dei suoli dei vasi**

In tale riunione i consulenti mostrano una presentazione in cui si sintetizzano i risultati e da essa appaiono le prime perplessità in merito alla variabilità dei dati che appare troppo bassa fra le diverse repliche.

Queste considerazione derivano dalla pratica degli esperimenti scientifici, dove sebbene si cerchi di minimizzare al massimo la variabilità, essa non può abbassarsi oltre ad un certo punto a causa della variabilità casuale indotta nei diversi passaggi a cui i singoli campioni indipendenti (le repliche) vengono sottoposti. Tale variabilità è indotta i) da quella biologica, intrinseca di individui vegetali diversi, con la conseguente variabilità dell'effetto sulla stimolazione delle comunità microbiche del suolo in vasi indipendenti sottoposti a condizioni ambientali che possono variare come l'irrigazione e l'irraggiamento, ii) dalle operazioni di processamento dei campioni quali il campionamento, l'estrazione degli analiti e l'analisi strumentale.

Tale variabilità è stata confrontata, per semplicità illustrativa in questa sede mostrando i "*totali*" delle concentrazioni per le seguenti classi: PCB, PCDD e PCDF.

Occorre ricordare, ai fini della comprensione dei risultati, che le etichette dei barattoli consegnati al laboratorio riportavano sia l'identità del campione (trattamento verso controllo) che il numero della replica, ovvero i campioni erano "in chiaro", ad eccezione dei campioni "spia" (campioni equivalenti a una replica, ma contrassegnati da un diverso codice) che riportavano un numero diverso. La variabilità delle concentrazioni tra le repliche verrà espressa mediante il coefficiente di variazione percentuale (CV%), nel seguito indicato anche semplicemente CV.

I problemi riscontrati dalla valutazione dei risultati sono i seguenti:

- Per PCB, bassissima variabilità tra le repliche dei controlli (CV% 1-4%, ad eccezione di C6 dove è ~50%); le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità simile a quella dei controlli (CV%: 1-6%) o addirittura più bassa: T1 e T10 con CV% dello 0.04% e 0.4% rispettivamente. Il valore dei PCB totali per il campione spia differiva dell'11% rispetto alla replica da cui derivava, mentre i totali delle tre repliche "in chiaro" differivano fra loro dello 0.2-2.5%.
- Per PCDF, ancora bassa variabilità tra le repliche dei controlli (CV%: 0.3-10%), ad eccezione solo di C6 dove è ~130%; le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità simile a quella dei controlli (CV%: 2-8%). Per PCDF, il campione spia ha una concentrazione che differisce del 6% rispetto a quella della replica da cui deriva e mentre le tre repliche della stessa tesi differiscono fra loro dello 1-5%.
- Per PCDD vi è invece elevata variabilità tra le repliche dei controlli (CV%: fino a 43%); solo in alcuni casi C1_t2, C2_t2, C4_t2, C5_t1, C7_t1 e C7_t2 la variabilità è bassa (CV% 3- 13%); le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità molto più bassa (CV%: 1-27%). Per PCDD, il campione spia ha una concentrazione che differisce dell'24% rispetto a quella della replica corrispondente, mentre le tre repliche della stessa tesi differiscono fra loro dello 6-18%.
- Per As e Hg, bassa variabilità tra le repliche dei controlli (CV%: 0.2-5%) ad eccezione solo di C6 per Hg dove è ~15% e C4 al t2 dove è ~18%); le repliche dei trattamenti mostrano un range di variabilità più grande di quello dei controlli (CV%: 1-16%), fatta eccezione per P10

dove CV%: 0.1%. Per As e Hg, i risultati del campione spia mostra valori praticamente identici a quelli derivante dalla stessa replica.

In sintesi, la variabilità (CV% fra le repliche) riscontrata per PCB, PCDF e metalli appare anomala in quanto troppo bassa se confrontata con l'esperienza specifica dei consulenti ed i dati riportati in letteratura per l'analisi di suoli con analogo tipo di contaminazione. La variabilità per le PCDD, pur apparentemente più alta rispetto alle altre classi di analiti, risulta essere comunque troppo bassa rispetto ai valori attesi se legata alle basse concentrazioni presenti nei campioni.

Tali perplessità vengono riportate nel verbale della riunione: "I consulenti evidenziano come dal punto di vista statistico è molto improbabile ottenere simili valori di deviazione standard in esperimenti analoghi, in particolare con una matrice quale il suolo. Tali bassi valori di variabilità sono anomali quando confrontati con analoghe misurazioni riportate nella letteratura scientifica internazionale. È abbastanza difficile motivare un simile fenomeno, pur con il meticoloso processo di omogeneizzazione al quale sono stati sottoposti tutti i campioni. Si concorda comunque sulla necessità di approfondire la questione.". Inoltre, collegato al punto precedente, viene presentata un'altra criticità legata al campione di validazione per il laboratorio ovvero un campione spia, siglato con un codice differente dalle repliche delle quali invece a tutti gli effetti appartiene. La criticità è dovuta al fatto che questo campione a dispetto dell'estremamente bassa variabilità presente nelle repliche collegate si discosta da queste in modo evidente".

2) GdL del 29 settembre 2016: ulteriori analisi dell'incertezza e confronto con letteratura

L'allarme su un'anomala bassa variabilità dei risultati ottenuti sulle repliche è stato poi riportato alla successiva riunione del GdL. In questa riunione, come emerge dal verbale, viene mostrata una presentazione sull'analisi dell'incertezza. Da questo lavoro di approfondimento vengono confermate alcune criticità già espresse durante la precedente riunione del GdL. Più in dettaglio rispetto a quanto mostrato in precedenza, è stato osservato, dopo un'attenta analisi della letteratura scientifica internazionale, che in esperimenti analoghi sulle stesse classi di molecole (ad es. PCB) la variabilità (espressa come coefficiente di variazione percentuale, CV%) **appare generalmente ben più alta di quella che si riscontra nei dati prodotti dal laboratorio che ha analizzato i campioni t0 e t2.**

Ad esempio, in un esperimento di accumulo di PCB in *Cucurbita pepo*, nel quale la variabilità relativa alla disomogeneità delle concentrazioni di PCB nel suolo è stata minimizzata grazie all'adozione della tecnica della *Japanese Slab Cake* (tecnica di campionamento incrementale usata per ottenere campioni rappresentativi e adottata anche per la preparazione del terreno dei vasi e dei contenitori dei suoli conferiti al laboratorio per le analisi), Low et al., 2010 hanno ottenuto per i PCB la seguente variabilità: 6.5 ± 0.95 mg/kg (CV%:15) nel suolo iniziale e 7.1 ± 0.43 mg/kg (CV%: 6) alla fine del trattamento con pianta. Questi valori di CV%, riferiti ai PCB totali, sono generalmente più alti rispetto a quelli forniti dal laboratorio per i campioni t0 e t2 (dove in alcuni casi il CV% si attestava su valori compresi tra 0.04 e 0.4%.

In un lavoro di stima dell'incertezza nel campionamento e nell'analisi di PCB e altre sostanze (PAH) da suoli contaminati a Brighton (UK), Zhou et al. (2014) valutano il contributo dell'incertezza dipendente dalle procedure analitiche, dal campionamento e da cause geochimiche (variabilità spaziale). Analizzando i loro dati, si può osservare che per otto punti di campionamento con campioni presi in doppio (replicati sperimentali) e analizzati due volte (replicati analitici), la variabilità appare come segue: CV% medio per i PCB totali per tutti campioni e i duplicati analitici appare del 24%, mentre solo la variabilità analitica dei due campioni appare intorno al 10-11%. Mentre il primo valore riflette anche la variabilità spaziale fra i campioni, il secondo CV% mostra la variabilità insita nell'iniezione dello stesso campione estratto (variabilità strumentale). Analogamente, in un lavoro in cui sono state valutate ripetibilità e riproducibilità durante un test

inter-laboratorio (Karstensen et al., 1998) su campioni di suolo e una miscela analitica standard per 9 congeneri di PCB è stato mostrato che nel caso di misure di ripetibilità (all'interno del laboratorio) i CV% si collocavano per i singoli congeneri fra 5-21% nel caso dei campioni di suolo e 3-7% nel caso dello standard mentre le misure di riproducibilità (variabilità fra laboratori) avevano CV% più elevati: da 27-102% (suolo) a 8-39% (standard).

Nella riunione del GdL (da verbale) "Nastasio evidenzia inoltre il fatto di come attualmente siano stati consegnati da INDAM solo dei fogli di lavoro excel e non dei rapporti di prova ufficiali pertanto al momento non è possibile perseguire alcuna forma di rivalsa o contestazione in via ufficiale".

Durante la riunione del GdL viene proposto di approfondire l'indagine statistica, cosa che viene fatta nelle settimane seguenti con ulteriori elaborazioni da parte del Prof. Raspa del DICMA. Dopo alcune prove di valutazione di parametri quali l'inerzia (totale ed interclasse) si decide che il miglior parametro per valutare i risultati e paragonarli alla letteratura è proprio il coefficiente di variazione delle concentrazioni delle repliche, calcolato congenere per congenere, che viene eseguito e mostrato in seguito. Tuttavia, vista i) la delicatezza della questione, ii) l'importanza dei dati per la prosecuzione die lavori, iii) la non specifica esperienza dei consulenti negli aspetti quantitativi di analitica chimica e pertanto iv) la necessità di un supporto imparziale e autorevole, i consulenti chiedono di procedere ulteriormente per fugare i dubbi sulla significatività o meno della bassa variabilità riscontrata nei campioni. Per tali motivi, i consulenti hanno quindi contattato un'istituzione ufficiale quale il Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA.

3) Contatto con il Servizio di Metrologia Ambientale dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) di Roma

Il giorno 13 ottobre 2016 viene comunicato al GdL via mail dal Prof. Di Guardo l'intenzione di entrare in contatto con il Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA (http://www.isprambiente.gov.it/it/i-laboratori-ispra/metrologia-ambientale) che ha come *mission* quella di assicurare la confrontabilità e l'accuratezza dei dati analitici derivanti dalle attività di monitoraggio/controllo ambientale. Viste le incongruenze e le anomalie emerse nei dati prodotti dal laboratorio analitico, viene fatto rilevare che questo contatto potesse garantire una *guidance* imparziale per potere giudicare la validità del dato e quindi poterlo poi usare nelle elaborazioni successive. Per queste attività il Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA rappresenterebbe un ente di riferimento istituzionale, in diretto contatto con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare.

Il primo contatto telefonico con la Dr.ssa Stefania Balzamo, responsabile del Servizio, avviene il 14 ottobre, al quale fa seguito uno scambio di mail che la stessa Dott.ssa Balzamo ha autorizzato a diffondere a tutti i membri del GdL (**Allegato 4**). Di seguito ne viene riportato un breve estratto.

Dalla mail della Dott.ssa Balzamo e dai dati da lei riportati si evince che "Per i PCB analizzati mediante GC-MS la media dei CV% sulla ripetizione delle rette di taratura (quindi solo strumentale) varia tra 5 e 10%" mentre su PCBdl, PCDD/Fs il coefficiente di variazione percentuale medio va da circa il 5% all' 8.7%.". Ricordiamo che questa variabilità è riferita solo a quella strumentale, ovvero legata alla misura di miscele standard di PCB, PCDD/Fs puri in solvente e rappresenta le condizioni ideali, minime, del CV atteso. Quando intervengono attività di preparazione, estrazione e purificazione di un campione ambientale (anche applicando tecniche di miscelazione dei suoli come la *Japanese Slab Cake*), la variabilità può solo aumentare. In presenza anche di ripetizioni indipendenti (es. i singoli vasi di ogni trattamento) occorre poi considerare una variabilità aggiuntiva: quella biologica (variabile sviluppo della pianta e del suo apparato radicale, flora batterica in rizosfera) e quella legata alle operazioni "colturali" (irrigazione, misura potenziale redox, umidità). Ovvero il valore di CV % dovrà essere necessariamente maggiore del 5-10%. I

valori prodotti dal laboratorio mostrano invece dei coefficienti di variazione straordinariamente bassi (di seguito i valori al T2; i controlli (T0) non si discostano di molto). Ad esempio sono state calcolate, per tutti i trattamenti e tutti i congeneri di ciascuna famiglia di inquinanti, le percentuali dei coefficienti di variazione delle terne di repliche con valori ≤ 5% e ≤ 3% e si è ottenuto: per i PCBs percentuali rispettivamente del 66 e del 41%, per i PCDFs del 71 e del 58% e per i PCDDs del 20 e del 10%.

Stante le valutazioni sopra esposte appare scarsamente probabile che possa verificarsi che elevate percentuali di terne di misure (66-71%) possano avere variabilità interna così bassa, testimoniando la presenza di anomalie evidenti. Nel caso dei PCDD i valori più alti di CV possono essere dovuti ai livelli di diossine nei campioni, considerevolmente più bassi rispetto ai furani.

In seguito al primo contatto e grazie alla disponibilità della Dr.ssa Balzamo si programma una visita presso il laboratorio del Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA a Roma per il giorno 15 novembre 2016. All'incontro partecipano il prof. Di Guardo per DSAT, il prof. Raspa per DICMA e la dott.ssa Sale per ERSAF. In tale incontro sono stati sostanzialmente condivisi e confermati i dubbi in merito ai valori estremamente bassi della variabilità, come risulta dal verbale interno dell'incontro (firmato da Di Guardo, Raspa e Sale, **Allegato 5**), che è stato inviato per posta elettronica ai membri del GdL in data 16 novembre 2016. Nell'incontro si suggerisce di far valutare i dati prodotti dal laboratorio da ARPA di Regione Lombardia, in quanto ente territoriale garante della qualità dei dati (come ad esempio nei contenziosi sulle analisi nei siti contaminati).

4) GdL del 30 novembre 2016: aggiornamenti sulla valutazione dell'incertezza dopo incontro con ISPRA e suggerimenti per la prosecuzione del lavoro

In tale riunione, presenti anche l'Ing. Angelo Elefanti della DG Ambiente, Energia e Sviluppo Sostenibile di Regione Lombardia, e il dott. Roberto Moreni, Commissario Straordinario per il SIN Brescia Caffaro, il Prof. Di Guardo illustra alcune elaborazioni dei dati, supportato dal prof. Raspa, dove mostra le valutazioni e le analisi, statistiche e di letteratura, che a giudizio dei consulenti fanno emergere in modo evidente anomalie sui dati presentati, riferite in particolare a una variabilità troppo bassa fra le concentrazioni degli analiti riscontrate nei campioni di suolo delle tre repliche di uno stesso trattamento e difficilmente compatibili con la variabilità che ci si dovrebbe attendere. Viene fatto in particolare notare come la variabilità riscontrata nei dati prodotti dal laboratorio sia addirittura inferiore a quella che ci si aspetterebbe dalla sola componente analitica (generalmente compresa tra il 5 ed il 10% del coefficiente di variazione), ovvero quella che risulterebbe dall'analisi ripetuta di uno stesso standard puro. Essendo i dati prodotti dal laboratorio derivanti da tre campioni di suoli indipendenti (repliche), alla variabilità analitica occorrerebbe aggiungere quella derivante dall'attività di degradazione in vaso (biologica), di coltivazione, di campionamento, estrazione e purificazione del campione. In questo modo la variabilità complessiva si attesterebbe a coefficienti di variazione superiori al 15%.

Viene quindi illustrata l'analisi dell'incertezza dei dati prodotti mediante la distribuzione delle frequenze cumulate dei coefficienti di variazione delle repliche dei trattamenti, calcolati congenere per congenere, che mostrano diversi livelli di variabilità (**Allegato 6**). Da questa analisi si evince che la percentuale dei CV con valori minori o uguali a 5% è per i PCB più del 60%, per PCDF più del 70% e per i PCDD più del 20%. Alcune repliche mostrano, in particolare per certi congeneri, un CV variabile da 0,2 a 2 %. Il prof. Raspa riporta che i grafici cumulati sono stati costruiti prendendo una grande quantità di dati di concentrazione, quelli usati per il calcolo di 720 e 432 CV per i PCB (trattamenti e controlli), 100 e 60 CV per PCDF e 70 e 42 per PCDD. Il prof. Di Guardo comunica inoltre, a supporto della tesi sopra esposta, quanto emerso durante l'incontro con la dott.ssa Stefania Balzamo del servizio di Metrologia ambientale di ISPRA.

5) Considerazioni conclusive sui dati prodotti dal laboratorio per i tempi t0 e t2

In definitiva, si rinnova la posizione scientifica, sottolineando l'anomalia e l'inutilizzabilità dei dati trasmessi dal laboratorio, esecutore delle analisi per i tempi t0 e t2, stante le criticità sopra esposte e le informazioni ad oggi disponibili, tali da condizionare ed inficiare la corretta prosecuzione dei lavori previsti nei contratti di collaborazione.

Si declina inoltre, qualsivoglia attività in capo al gruppo di ricerca, che esuli dalle competenze e dalle specifiche contrattuali, quali in particolare la verifica tecnica, con una metodologia rigorosa dei dati prodotti, dei rapporti di validazione e delle modalità operative del laboratorio, al fine dell'accertamento della bontà e qualità dei dati sotto il profilo scientifico.

Milano, 12 gennaio 2017

Per il DSAT

Prof. Antonio Di Guardo

Prof. Elisabetta Zanardini

Per il DeFENS

Prof.sa Sara Borin

Bibliografia

Karstensen, K.H., Ringstad, O., Rustad, I. l, Kalevi, K., Jørgensen, K., Nylund, K., Alsberg, T., Ólafsdóttir, K., Heidenstam, O., Solberg, H., 1998. Methods for chemical analysis of contaminated soil samples—tests of their reproducibility between Nordic laboratories. Talanta 46, 423–437.

Low, J.E., Whitfield Åslund, M.L., Rutter, A., Zeeb, B.A., 2010. Effect of Plant Age on PCB Accumulation by ssp. Journal of Environment Quality 39, 245. doi:10.2134/jeq2009.0169

Zhou, J.L., Siddiqui, E., Ngo, H.H., Guo, W., 2014. Estimation of uncertainty in the sampling and analysis of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil in Brighton, UK. Science of The Total Environment 497–498, 163–171. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.097

Allegati

Allegato 1 - Background document per la messa a punto di un protocollo per gli esperimenti di *rhizoremediatoin/phytoextraction*

Allegato 2 - Protocollo preparazione suolo per esperimenti

Allegato 3 - Protocollo sperimentazione in serra

Allegato 4 – Scambio di email intercorso da Dott. Di Guardo e Dott.ssa Balzamo

Allegato 5 - Verbale interno dell'incontro dei rappresentanti del GdL con il servizio metrologico di ISPRA

Allegato 6 - Frequenze di campioni che mostrano diversi livelli di variabilità

Background document per la messa a punto di un protocollo per gli esperimenti di rhizoremediation

Indice

Scopo....2
1. Specie vegetali impiegate....2
2. Specie microbiche testate....4
3. Numerosità e tipo di tesi....6
4. Condizioni sperimentali....7
5. Durata esperimento....9
6. Degradabilità di PCB, Diossine e Furani....9
7. Capacità di fitoestrazione di mercurio e arsenico....10
8. Metaboliti di PCBs nel suolo e nelle piante....12
9. Tecniche adottate per ridurre la variabilità fra le repliche....13
10. Tipo e numerosità delle matrici....15
11. Emivita e/o degradation rate per i congeneri analizzati....16
12. Fitossicità....24
Bibliografia....25

Scopo

Lo scopo del background document è di fornire gli elementi di base per potere orientare le scelte da operare nell'implementazione pratica degli esperimenti di phytoextraction/rhizoremediation. Il documento è stato messo a punto valutando la letteratura scientifica degli ultiimi 20 anni circa, valutando punti elencati di seguito.

1. Specie vegetali impiegate

Numerose specie vegetali, principalmente erbacee, sono utilizzate nelle sperimentazioni incluse nella letteratura scientifica analizzata in merito alla phytoremediation di suoli inquinati da PCB. Un'analisi generale delle specie vegetali impiegate nei suddetti lavori indica che non esiste una specie vegetale universalmente riconosciuta e applicabile per il biorisanamento di tali suoli. Al contrario, la lista delle specie impiegate è molto ampia, ed include sia specie di comune interesse agrario sia specie spontanee. Si noti che molti lavori condotti in condizioni di campo impiegano proprio specie vegetali spontanee e/o specie di facile coltivazione, e tradizionalmente usate come foraggio nel nord Italia. Quest'ultimo è il caso dell'erba medica (*Medicago sativa*) che diversi autori (Teng et al 2010, Tu et al. 2011, Xu et al. 2010) hanno indicato capace di rimuovere, in condizioni di campo, una maggiore quantità di PCB dal suolo rispetto al controllo non trattato, sia da sola (Tu et al. 2011) sia quando inoculata con funghi arbuscolari micorrizzici e *Rhizobium* sp. (Teng et al. 2010). La stessa specie, in condizioni di crescita controllate in growth chamber, ha mostrato la capacità di rimuovere fino al 60% di PCB presenti in un suolo artificialmente inquinato con 100 mg/Kg di Aroclor 1248, rispetto al 20% di rimozione del suolo controllo non piantato (Chekol et al. 2004). Tra le specie spontanee utilizzate in letteratura si annoverano *Carex normalis* e *Festuca arundinacea* (Whitfield Åslund et al. 2007), impiegate in campo sia come monocoltura, o proposte per futuri trattamenti in consociazione con la specie edibile *Cucurbita pepo,* nel trattamento di un suolo inquinato da PCB (Aroclor 1260/1254, 50 µg/g). La capacità degradativa della specie *Festuca arundinacea* è stata analizzata da altri autori (Chekol et al. 2004, Secher et al. 2013) crescendo la pianta in condizioni controllate in growth chamber e confermandone le potenzialità sia su suolo naturalmente inquinato (PCB totali 104 mg/Kg) sia in suolo spiked con Aroclor 1248 (100 mg/Kg).

Ficko e coautori (2010) in una recente analisi della letteratura scientifica inerente l'uso di specie spontanee per la phytoremediation di suoli inquinati hanno sottolineato che alcune di queste specie sarebbero in grado di estrarre nella porzione epigea una quantità di PCB pari o maggiore della specie *Curcurbita pepo ssp. pepo* (zucca), nota specie accumulatrice. Tale indicazione denota che un'attenta valutazione delle specie naturalmente presenti in un dato sito da trattare è importante per la scelta delle piante da impiegare, poiché piante dotate di potenzialità di biorimedio potrebbero già essere presenti ed adattate a vivere nelle peculiari condizioni estreme (dovute all'inquinamento) del sito stesso.

Tra i generi vegetali impiegati nei lavori di letteratura in condizioni di serra i più diffusi sono *Brassica* (*B. napus, B. nigra*), *Cucurbita* (*C. pepo, C. pepo spp. pepo, C. maxima, C. moschata*), *Medicago* (*M. sativa*, *M. polymorpha*), *Nicotiana* (*N. tabacum*) e *Panicum* (*P. virgatum, P. variegatum, P. clandestinum*). I risultati delle sperimentazioni non sempre sono positivi, ad esempio sia *B. nigra* sia *M. polymorpha*, nelle condizioni

saggiate, risultano incapaci di accumulare PCB in modo significativamente maggiore del controllo non piantato (Dzantor, et al. 2001; Singer et al. 2003). Low e coautori (2010) evidenziano come nel caso di *Cucurbita pepo spp. pepo* sia essenziale considerare la durata della sperimentazione poiché la quantità di PCB rimossa dal suolo è maggiore all'aumento della biomassa vegetale. Viceversa un recente studio (Qin et al. 2014) ha indicato come l'estrazione di PCB dalle piante impiegate (*Cucurbita spp.* and *Cucumis sativus*) sia trascurabile e che le consistenti rimozioni osservate nei trattati piantati (42.7% con *C. pepo* e 40.1% con *C. moschata*) siano attribuibili più a fenomeni di biodegradazione occorsi nel suolo, da parte della componente microbica, e stimolati da queste piante.

Alcune specie vegetali (per esempio *Atropa belladonna, Solanum aviculare*) sono state saggiate nei lavori di letteratura (Mackova et al. 1997) esclusivamente in vitro, mediante l'uso di colture cellulari, e rappresentano pertanto situazioni inadatte a qualsiasi valutazione comparativa a condizioni di serra e/o campo.

Un elenco completo delle specie riportate dalla letteratura analizzata è presente nell'allegato tecnico (Tabella 1). Si evidenzia inoltre che lo studio della letteratura condotto per la stesura del presento documento ha escluso la produzione scientifica relativa all'impiego di piante transgeniche poiché, al di là di qualsiasi valutazione scientifica, il loro utilizzo sarebbe comunque incompatibile con legislazione vigente.

La bibliografia analizzata in merito alla capacità delle piante di fitoestrarre mercurio dal suolo include pubblicazioni che hanno studiato le specie vegetali spontanee e coltivate. Tra queste specie sono comprese *Oryza sativa* (Li et al. 2013b), *Brassica juncea* e *B. napus* (Wang et al. 2014), *Brassica juncea* e *Lupinus albus* (Franchi et al. 2015), *Dittrichia viscosa* (Shehu et al. 2014), la felce *Pteris vittata* (Su et al. 2007). Li e coautori (2013b) hanno realizzato uno studio preliminare su 26 cultivar di riso per individuare quelle che accumulano meno mercurio nei semi. Il lavoro condotto da Shehu e collaboratori (2014) ha analizzato la capacità di bioaccumulo di 17 specie cresciute su suolo contaminato in una ex-area industriale, in Albania. Le specie spontanee studiate sono *Dittrichia viscosa*, *Echium plantagineum*, *Tamarix dalmatica*, *Limonium anfractum*, *Crithmum maritimum*, *Saccharum ravennae*, *Phragmites communis*, *Typha angustifolia*, *Salix alba*, *Imperata cylindrica*, *Populus alba*, *Euphorbia paralias*, mentre le specie di interesse agrario ivi coltivate, e analizzate, sono *Zea mays*, *Medicago sativa* e *Allium cepa*. Le specie che hanno fornito migliori risultati sono state *Dittrichia viscosa* e *Medicago sativa,* tuttavia il lavoro ha evidenziato che nessuna delle specie studiate è classificabile come iperaccumulatrice (Shehu et al. 2014).

Per quanto riguarda l'arsenico, una delle specie più efficienti per la fitoestrazione è la pianta iperaccumulatrice Pteris vittata (Lessl et al., 2014; Mandal et al., 2014; Chen et al., 2002; Wang et al., 2000); altri studi invece sono stati condotti utilizzando Cicer arientinum (Srivastava et al., 2014) e Ludwigia octovalvis (Titah et al., 2013).

La bibliografia analizzata in merito alla capacità delle piante nella phytoremediation- rhizodegradation di diossine e furani include pubblicazioni che hanno studiato le seguenti specie vegetali: bermuda grass (Cynodon dactylon), bent grass (Agrostis palustris Huds.), lawn grass (Zoysia japonica) e white clover (Trifolium repens L.) (Wang et al, 2009). La sperimentazione è stata condotta in vasi contenenti suolo artificialmente contaminato da dibenzofuran (DBF) alla concentrazione di 1000 mg kg−1 definita da un pre test al fine di valutare le germinazione dei semi a diverse concentrazioni di DBF (200, 500, 1000 mg/kg).

Le tesi per ogni tipo di specie vegetale sono state 4 ed allestite in 5 repliche: suolo sterile contaminato da DBF senza piante; suolo non-sterile contaminato da DBF senza piante; suolo sterile contaminato da DBF con piante; suolo non-sterile contaminato da DBF con piante.

I risultati ottenuti hanno mostrato che i vasi piantati con white clover (Trifolium repens L.) hanno mostrato dopo 60 giorni di sperimentazione la massima crescita di biomassa radicale, la maggiore concentrazione di batteri DBF-degradanti e la maggiore rimozione di DBF (concentrazione residua era di 333mg/kg) in confronto alle tesi piantate con le altre specie vegetali.

Wang and Oyaizu nel 2011 hanno inoltre valutato la possibilità di incrementare le rese di rimozione di tali composti in una sperimentazione con suolo artificialmente contaminato da sei composti: DF, 2,8-DCDF, 1-CDD, 2,7-DCDD, 1,2,4-TCDD, e 1,2,3,4-TCDD. Lo studio è stato condotto sempre in vasi contenenti 400 mg di suolo e utilizzando la specie vegetale white clover (Trifolium repens L.) inoculata con il ceppo di Comamonas sp. KD7 capace di utilizzare DF come fonte di carbonio.

I semi di white clover inoculati con ceppo Comamonas sp. KD7 hanno mostrano una maggior efficienza di germinazione e di allungamento radicale. Nei vasi piantati e inoculati sono state ottenute le migliori rese di rimozione, con % residue di DF, 2,8-DCDF, 2,4,8-TCDF, DD, 1-CDD, 1,2,4-TCDD, e 1,2,3,4-TCDD, pari a 13%, 43%, 47%, 24%, 31%, 34%, e 44%, ottenute dopo 12 settimane. L'unica eccezione è stata per 2,7-DCDD.

Saiki et al.2003 riportano una sperimentazione di laboratorio condotta in water-cultured microcosms (senza vermiculite) e soil-cultured microcosms (con vermiculite) con piantine della specie vegetale siratro (leguminosa) Macroptilium atropurpureum, inoculata con ceppo ricombinante di Rhizobium PBK3-IS (capace di esprimere costitutivamente la carbazolo CAR 1,9a-diossigenasi) e aggiunta di 25ug di DF. E' stata osservata una rimozione del 48% e del 52% di dibenzofurano dopo 3 giorni a 25°C, rispettivamente in water-cultured microcosms e soil-cultured microcosms. Rimozione nei controlli negativi (inculati con wild-type di Rhizobium) per i water-cultured microcosms è risultato trascurabile, mentre del 20% quello di soil-cultured microcosms. (probabilmente dovuta ad assorbimento a vermiculite).

Quindi il ceppo ricombinante inoculato con siratro mostra capacità degradative di DF sia in water-cultured sia in soil-cultured microcosms. Gli autori indicano il rilevamento nei noduli radicali tritati di piccole concentrazioni (non definite) di 2,2',3-triidrossibifenile, prodotto putativo del DF, ma non nelle radici.

2. Specie microbiche testate

Solo una minima parte (13) dei lavori scientifici analizzati ha previsto l'impiego di specie microbiche durante le sperimentazioni effettuate, mentre la maggior parte delle referenze ha realizzato esperimenti di phytoremediation senza applicare trattamenti di bioaugmentation alle specie vegetale scelte. Quando applicata, la bioaugmentation con microrganismi degradatori poteva includere funghi, batteri, o microrganismi appartenenti ad entrambi i domini (Teng et al. 2010). Tra le referenze che includono l'uso di microrganismi, 4 non riguardano una sperimentazione di phytoremediation, indagando piuttosto il ruolo di diversi composti vegetali nella promozione dell'attività degradativa di PCB nel suolo (Gilbert et al. 1997, Leigh et al. 2002, Dudášová et al. 2012) oppure le capacità degrative esplicate in condizioni di laboratorio dal fungo *Lentinus tigrinus* inoculato in un microcosmo allestito con suolo storicamente inquinato da Aroclor 1260 (Federici et al. 2012). Il lavoro pubblicato da Dudášová et al. 2012 indaga l'effetto stimolatore di alcuni terpeni sul batterio *Pseudomonas stutzer*i e ne riporta una maggiore capacità degradativa in presenza di tali sostanze. *P. stutzeri* infatti degrada fino il 18,9% del PCB totale nel suolo controllo mentre raggiunge le seguenti rese quando trattato rispettivamente con bifenile, carvone, limonene ed estratto vegetale: 32,7%, 33,6, 32,9%, 50,5% (Dudášová et al. 2012). Leigh e coautori (2002) usano alberelli di *Morus* sp. di 1 anno di

età per allestire dei rizotroni e saggiano l' effetto di 3 diversi composti aromatici (flavoni), rilasciati dalle piante tramite gli essudati radicali, sulla crescita del batterio *Burkholderia xenovorans* LB400, scelto in quanto noto degradatore di PCB. I risultati riportati da questi autori mostrano che nelle condizioni applicate *Morus* sp. ha radici fini con mortalità del 58% che rilasciano nel terreno flavoni in grado di stimolare la crescita di *Burkholderia xenovorans* LB400. Analizzando la bibliografia nel suo insieme l'applicazione di ceppi batterici o fungini non fornisce risultati inequivocabili a favore di un tipo di trattamento. Talora l'applicazione di funghi micorrizici arbuscolari (*Acaulospora laevis* e *Glomus mosseae*) migliora le rese di rimozione di Aroclor 1242 sia nella rizosfera sia nel suolo non influenzato dagli essudati radicali, aumentando l'abbondanza di geni degradativi (Qin et al. 2014). In altri casi (Secher et al. 2013) la specie *F. arundinacea* è stata piantata su un suolo inquinato da PCB (104 mg/Kg) e mediamente le rese di degradazione maggiori sono state ottenute nei vasi piantati ma non bioaugmentati, mentre le rese inferiori sono state rilevate nei vasi piantati ed inoculati con *Burkholderia xenovorans* LB400. L'utilizzo di tale ceppo batterico ricorre in differenti pubblicazioni (Leigh et al. 2002, Liang et al. 2014, Secher et al. 2013) e viene giustificato dagli autori dalla capacità degradativa di PCB precedentemente descritta in letteratura. Al contrario, nessun autore riporta esperimenti di "autochthonous bioaugmentation" in cui le piante vengono trattate con un inoculo batterico precedentemente arricchito e/o isolato dal suolo contaminato da PCB dello sito stesso da trattare. La "autochthonous bioaugmentation" è, nell'ambito delle tecnologie di biorisanamento, un approccio la cui validità è stata dimostrata da diversi autori in matrici ambientali contaminate diverse, quali per esempio sedimenti marini, in combinazione con la biostimolazione (Nikolopoulou et al. 2013). Tale approccio potrebbe essere indagato anche nel caso di suoli contaminati, con lo scopo di concepire protocolli di risanamento ad-hoc per il sito in esame.

Per quanto concerne la fitoestrazione di mercurio solo una tra le pubblicazioni analizzate riporta l'uso di batteri appartenenti alle specie *Gordonia alkanivorans*, *Ralstonia pikettii* e *Sporosarcina luteola*, abbinato alla biostimolazione con tiosolfato. In questo caso, le specie batteriche impiegate erano state precedentemente isolate da un suolo inquinato da arsenico (41.1 mg kg^{-1}) mercurio (67 mg kg^{-1}). Da questo lavoro emerge che tale trattamento applicato alla specie *Lupinus albus* migliora la capacità di fitoestrazione della pianta, coltivata in microcosmi in condizioni sperimentali controllate (growth chamber) (Franchi et al. 2015). Nel caso della specie *Brassica juncea*, al contrario, si ottengono risultati migliori solo con la biostimolazione (aggiunta di tiosolfato) e senza il trattamento con i batteri (Franchi et al. 2015).

Per quanto riguarda la fitoestrazione dell' arsenico solo solo due le pubblicazioni in cui vengono utilizzati batteri. In Srivastava et al., 2014 viene utilizzato nbri05 (resistente all' arsenico) insieme a Cicer arientinum, mentre in Titah et al., 2013 un consorzio microbico (Sphingomonas paucimobilis, Arthtobacter globiformis, Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Rhizobium rhizogenes and
Rhizobium radiobacter) iniseme a Ludwigia octovalvis.

Habe et al 2001 riportano uno studio preliminare di degradazione di diossine e furani utilizzando un ceppo di Pseudomonas sp. CA10 in grado di degradare carbazolo. La sperimentazione è stata condotta in soil slurry microcosms con suolo addizionato da diossine a diverse condizioni al fine di valutare l'efficienza degradativa di 2,3-dichlorodibenzo-p-dioxin (2,3-Cl2DD) da parte del ceppo inoculato alle concentrazioni cellulari di 107 CFU/g soil e 109 CFU/g suolo. La concentrazione totale di 2,3-Cl2DD era di 1 ppm (1 µg/g suolo) ed è stata osservata una maggiore degradazione con una densità cellulare di 109 CFU/g suolo pari al 73% in 3 giorni, fino all' 80% dopo 7 giorni. La sperimentazione con suolo addizionato con congeneri individuali 2-ClDD, 2,3-

Cl2DD, 1,2,3-Cl3DD, o in miscela (2-ClDD+2,3-Cl2DD, 2-ClDD+1,2,3-Cl3DD or 2-ClDD+2,3-Cl2DD+1,2,3-Cl3DD) sempre alla concentrazione di 1 ppm (1 µg/g suolo) con inoculo di 109 CFU/g suolo ha mostrato degradazioni dei congeneri se aggiunti individualmente pari a 97, 89, e 52%, rispettivamente in 5 giorni e simili degradazioni se aggiunti in miscela.

Infine un'ulteriore sperimentazione in soil slurry microcosms con 20 g di suolo realmente contaminato con inoculo di CA10 di 1011 CFU/g peso secco ha mostrato una riduzione di PCDDs e PCDFs da 725 ng/g suolo a 665 ng/g (8.3%) con maggiori degradazioni dei congeneri basso clorurati presenti (Cl4DDs and Cl4DFs), ma anche capacità degradativa del composto 2,3,7,8-Cl4DD pari al 18.2%.

3. Numerosità e tipo di tesi

(numero controlli, condizioni variate, consociazioni)

Lo studio della letteratura ha evidenziato che le sperimentazioni effettuate in campo sono focalizzate su un'unica tesi (ad esempio Ficko et al. 2010, Ficko et al. 2011, Whitfield Åslund et al. 2007). Fa eccezione un lavoro in cui gli autori affrontano due diverse tesi, rappresentate da prove realizzate in aree con due diversi livelli di inquinamento (Kacálková et al. 2011). Le tesi vengono condotte in triplicato, e nel caso di lavori effettuati in campo la letteratura fa riferimento a tre diversi plot piantati e relativi plot controllo. In condizioni di serra alcuni lavori indicano un numero di tesi maggiori, generalmente rappresentate dal saggio di diverse specie vegetali nelle stesse condizioni (Qin et al. 2014) oppure dall'uso di una sola specie vegetale con e senza trattamenti ammendanti quali biostimolazione (Smith et al. 2007) e/o bioaugmentation con ceppi fungini e/o batterici (Liang et al. 2014; Qin et al. 2014b). Talora, nel caso di sperimentazioni svolte con suolo artificialmente inquinato, gli autori della pubblicazione hanno indicato più tesi corrispondenti alla crescita della pianta in presenza di diversi inquinanti addizionati nel suolo singolarmente o come miscela (Dzantor, et al. 2000, Meggo et al. 2013). Ulteriori variabili nelle tesi saggiate includono la modulazione della densità di semina (Whitfield et al. 2008) e l'induzione di cicli di allagamento e cicli redox successivi (Meggo et al. 2013, Chen et al. 2014).

Nel primo caso, lavorando sulla specie *C. pepo ssp. pepo* cv. Howden le piante sono state seminate a densità di crescita normale o concentrata in vasi di circa 26 litri. Questo lavoro rappresenta il secondo anno di sperimentazione per lo studio di fitoestrazione di PCB con *Cucurbita pepo* in campo e mostra un aumento di concentrazione di PCB nello stelo e nelle foglie dal primo al secondo anno. Al contrario, la concentrazione nell'apparato radicale non varia in modo significativo. La crescita di piante a maggiore densità riduce la biomassa vegetale e la concentrazione di PCB nello stelo (Whitfield et al. 2008).

Lo studio di Meggo e coautori (2013) fornisce utili considerazioni in merito all'opportunità di applicare cicli di allagamento nelle sperimentazioni condotte crescendo le piante in vaso in condizioni di serra. Da questo articolo emerge che le migliori rese di rimozione di PCB sono state ottenute nei reattori piantati e sottoposti a cicli redox, rispetto sia al controllo non piantato sia al piantato ma non allagato, ma si sottolinea altresì la difficoltà a creare condizioni di anossia dovute al trasferimento di ossigeno dalle radici al suolo. Il raggiungimento di condizioni di anossia è stato possibile (coltivando le specie *Panicum virgatum* e *Populus deltoids* x *nigra* DN34) solo tra il 12° e 14° giorno di sperimentazione, e si è accompagnato alla comparsa di stress e sofferenza nelle piante. Gli svantaggi di tale approccio sarebbero dunque relativi alla difficoltà di raggiungere tali condizioni in campo e alla necessità di valutare l'utilizzo di piante resistenti alle condizioni di allagamento (Meggo et al. 2013). Chen e coautori (2014) dimostrano che cicli redox migliorano, sia nel

trattamento piantato che nel non piantato, la rimozione di PCB accelerandola. I microrganismi responsabili della degradazione di PCB sembrano essere selettivamente promossi dagli essudati radicali nella rizosfera.
Alcuni autori includono nella sperimentazione, in serra o in campo, prove di crescita in consociazione. Li e coautori (2013), usando un suolo inquinato da PCB (7.22 mg/kg), saggiano *Festuca arundinacea* e *Medicago sativa* in consociazione. Le analisi microbiologiche indicano che la presenza di entrambe le piante in vaso stimola il numero di batteri totali, i batteri bifenile-degradanti e le attività enzimatiche. Al contempo le analisi chimiche mostrano però che la rimozione di PCB corrisponde al 39,6% dei PCB totali per *F. arundinaecea* da sola (32,7% in combinazione con *M. sativa*) mentre *M. sativa* da sola rimuove il 30,6% dei PCB totali (32,7% in combinazione con *F. arundinaecea*). *F. arundinaecea* risulta dunque essere la specie che rimuove una significativa maggiore quantità di PCB dal suolo (in particolare tri- tetra-penta CB), seminata da sola, probabilmente poiché ha una maggiore biomassa, sebbene la crescita in consociazione con *M. sativa* garantisca comunque una maggiore rimozione di tri-CB rispetto al controllo (Li et al. 2013).
La consociazione è proposta, sebbene non saggiata, quale valida strategia per aumentare la quantità di PCB estratti da suolo, usando *C. pepo* con *Carex* e/o *F. arundinaecea* anche da altri autori (Whitfield Åslund et al. 2007) dichiarando le tre specie buone candidate per la fitoestrazione di PCB.
L'irrigazione è un altro parametro scarsamente descritto, facendo eccezione per le sperimentazioni che prevedono cicli di allagamento e pochi altri casi. Nella prima categoria rientrano gli articoli Meggo et al. (2013), descritto nel paragrafo precedente, e Chen et al. (2014) che ha lavorato con *Oryza sativa* in serra fornendo alle piante 5 cm di acqua sulla superficie del suolo per 180 giorni e applicando un successivo periodo di asciugatura per 120 giorni fino ad arrivare al 60% di acqua nel suolo. Un lavoro riferisce genericamente di un'irrigazione alla capacità di campo (Checkol et al. 2004) o al bisogno (ad esempio Whitfield Åslund et al. 2007, Low et al. 2010). Smith et al (2007) lavora in serra, con diverse specie vegetali, irrigando a condizioni di saturazione ed usando un suolo artificialmente inquinato con 20 mg/Kg di Aroclor 1262. In altri due casi gli autori applicano un livello di irrigazione pari al 50 o 60% della capacità di ritenzione idrica del suolo in uso (Li et al. 2011, Lu et al. 2014).
Le pubblicazioni inerenti la fitoestrazione di mercurio includono un numero di tesi variabile in funzione del tipo di specie e/o cultivar saggiate (ad esempio Li et al. 2013b), oppure piante spontanee prelevate in tre siti diversi all'interno di un'area contaminata (Shehu et al. 2014) o ancora trattamenti molteplici (con e senza biostimolazione, bioaugmentation, entrambi i trattamenti; Franchi et al. 2015).
Per quanto riguarda l' arsenico le tesi che vengono generalmente considerate sono: piantato vs non piantato, piantato con aggiunta di fosforo vs piantato senza aggiunta di fosforo oppure piantato con aggiunta di microrganismi vs piantato senza aggiunta di microrganismi e infine piantato in suolo contaminato vs piantato in suolo spiked.

4. Condizioni sperimentali

(suolo (spiked o aged); ambiente (field, serra, lab); concimazione (minerale o organica); irrigazione; protezione da parassiti; durata del ciclo vegetale; pH; potenziale redox)

L'analisi della letteratura mostra che la maggior parte delle sperimentazioni è condotta in serra, e solo alcuni lavori si riferiscono a condizioni di campo. Alcune pubblicazioni invece si riferiscono a sperimentazioni in idroponica, in camera di crescita, o in microcosmi di diversa tipologia ma sempre riferibili a condizioni semplificate e non comparabili a quelle della crescita in serra e in pieno campo.

Il suolo può provenire da un sito inquinato oppure, spesso, gli autori lavorano con suolo artificialmente contaminato da uno o più congeneri di PCB, dei quali vanno in seguito a saggiare la concentrazione nelle tesi allestite. Quest'ultimo caso rappresenta una scelta di più semplice realizzazione poiché i congeneri sono noti, e gli intervalli di concentrazione rilevabili rientrano in condizioni definite e compatibili con la sopravvivenza della specie vegetale scelta. Non abbiamo riscontrato casi di utilizzo di suolo co-contaminato da PCB e metalli pesanti, situazione peculiare dell'area ex-Caffaro.

Molti articoli analizzati non includono informazioni specifiche in merito alla concimazione nella descrizione dei materiali e metodi applicati, lasciando supporre che nessun trattamento fertilizzante sia stato applicato.

Viceversa altri indicano i trattamenti eseguiti. In un esperimento in campo sono stati somministrati alle colture di *Helianthus annuus, Populus nigra* x *P. maximowiczii, Salix* x *smithiana, Zea mays* 30 g/m di NH_4NO_3 per ogni periodo vegetativo (Kacálková et al. 2011) durante la crescita su suolo inquinato (1530 µg/kg di PCB totali e 0.138-3.42 mg/kg di PAH totali). Le piante, in questa sperimentazione sono state irrigate e le infestanti rimosse, quest'ultima una pratica comune a diversi lavori di letteratura. Altri autori (Ficko et al. 2011) lavorando con le specie *Rumex crispus, Solidago canadensis, Chrysanthemum leucanthemum* su suolo inquianto da Aroclor 1248 (6.6 ± 0.85 µg/g) hanno impiegato una miscela fertilizzante composta da N-P-K in proporzione 6-12-14. Un altro caso è rappresentato dall'utilizzo di una soluzione nutritiva per piante (soluzione Hoagland) in quantità di 30 ml ogni settimana. Tale approccio è stato usato (Qin et al. 2014) in esperimenti di phytoremediation con *Cucumis sativus* e specie del genere *Cucurbita* su suolo contaminato con Aroclor 1242/1254 da 30 anni (concentrazione totale di PCB pari a 4.41 ±0.36 mg/kg). Anche la specie *Lolium perenne*, in una sperimentazione in serra, è stata trattata con una miscela fertilizzante NPK in concentrazione pari a 1 g/kg di suolo (Lu et al. 2014). Le specie *Festuca arundinacea* e *Medicago sativa* da sole o cresciute in consociazione usando un suolo inquinato da PCB (7.22 mg/kg) sono state trattate con 142.5 mg di NH_4NO_3 e 175 mg of KH_2PO_4 / 500 g suolo secco (Li et al. 2013). Infine Low e coautori (2010) riferiscono l'uso di 10 g di fertilizzante e 1 L di terriccio ogni 7,5 Kg di suolo contaminato impiegato per la phytoremediation con *C. pepo* spp. *pepo* in serra. Il parametro pH è raramente riportato nella letteratura scientifica, tuttavia se possibile è sempre raccomandabile raccogliere i dati chimico-fisici del campione di suolo iniziale.

Le sperimentazioni analizzate in merito alla fitoestrazione di mercurio sono state prevalentemente svolte in condizioni di campo, oppure in vasi coltivati all'aperto in campo nel caso della felce *Pteris vittata* (Su et al. 2007), e solo in un caso in condizioni controllate in camera di crescita (Franchi et al. 2015). In nessun caso sono riportate informazioni specifiche in merito ai regimi di irrigazione, alla protezione da infestanti o parassiti, mentre è possibile avere indicazioni in merito alla fertilizzazione. Nel caso del lavoro di Li et al. (2013b) 200 kg/ha di composto fertilizzante sono state addizionate al suolo il giorno in cui le piantine sono state trapiantate. Inoltre 60 kg/ha di urea e 100 kg/ha di composto fertilizzante sono stati somministrati 10 e 30 d dopo il trapianto. In una delle tesi realizzate nello studio condotto su *Pteris vittata* è stata somministrata alla pianta una soluzione fertilizzante N:P:K = 1:1:1 (Su et al. 2007) oppure una soluzione nutritiva Hoagland modificata. Per le sperimentazioni di fitoestrazione di mercurio è stato usato sia suolo artificialmente inquinato con cristalli o soluzioni di $HgCl_2$ (Su et al. 2007), o con $Hg(NO_3)_2$ in concentrazione 100 mg/kg (Su et al. 2007), sia suoli inquinati. Tra questi ad esempio *Oryza sativa* è stata coltivata in presenza di un quantitativo totale di mercurio pari a 4,2 ± 1,6 mg/Kg (di cui 0,53 ± 0,1 ng/g corrispondente MeHg) per valutare l'accumulo del metallo nel seme (Li et al. 2013b).

Per quanto riguarda l' arsenico la maggior parte degli studi è stata effettuata in campo o in serra (soltanto uno in idroponica). In nessun caso sono riportate informazioni riguardanti la protezione da infestanti o parassiti, mentre è possibile avere indicazioni in merito all' irrigazione e alla fertilizzazione. Srivastava et al., 2014 riporta che l' irrigazione è avvenuta ad intervalli regolari per mantenere il 60% dell' umidità, mentre Xu et al., 2014 riporta che l' irrigazione è avvenuta fino al 50% della field capacity.In alcuni studi i fertilizzati addizionati sono stati fosfato d' ammonio o N:P:K (15:15:15) sebbene in altri studi è stato messo in evidenza che concimazioni fosforiche possono ridurre l' accumulo dell' arsenico da parte della pianta

5. Durata esperimento

La durata degli esperimenti di phytoremediation condotti nella letteratura scientifica analizzata è molto variabile, anche in funzione delle condizioni sperimentali adottate, e va da un minimo di 14 ad un massimo di 730 giorni. La durata minima corrisponde alla coltivazione di *Phragmites australis* in idroponica usando un medium di coltura addizionato di DDT e una miscela di PCB (Chu et al. 2006), una situazione non comparabile alle condizioni di serra e/o campo. In condizioni di campo la durata minima è di 70 giorni (Whitfield Åslund et al. 2007), e quella massima di 730 (Ficko et al. 2011). In serra il tempo di durata è maggiormente variabile. Le specie del genere *Cucurbita* cresciute in serra vengono analizzate a 42 giorni (Low et al. 2011), oppure a 60 giorni (Li et al. 2011; Qin et al. 2014), o ancora intorno ai 90 giorni quando le foglie iniziano a mostrare segni di clorosi (Ficko et al. 2011). *Medicago sativa* in condizioni di serra viene saggiata generalmente intorno ai 150-180 giorni (Li et al. 2013, Dzantor, et al. 2000, Demrenova et al. 2005), in condizioni di campo la sperimentazione può durare 90 (Xu et al. 2010), 180 (Teng et al. 2010) e fino a 730 giorni (Tu et al. 2011). Si riporta inoltre che la durata delle sperimentazioni di fitoestrazione su suoli inquinati con mercurio è riportata solo da alcuni autori, e compresa generalmente tra i 18 e i 75 giorni. Quella invece per l' arsenico è compresa tra 18 e 1095 giorni.

6. Degradabilità di PCB, Diossine e Furani

(indicare se PCB tot, PCDD, PCDF e se congeneri quali)

Molti lavori riportano i risultati del test di phytoremediation considerando e riportando i valori di degradabilità del PCB totale (si elencano solo a titolo esemplificativo: Low et al. 2010, Checkol et al. 2004, Secher et al. 2013, Li et al. 2013). In alcune pubblicazioni viene dettagliato che la concentrazione di PCB totali fornita corrisponde alla somma dei singoli congeneri addizionati artificialmente al suolo utilizzato nella sperimentazione. Questo è per esempio il caso di un lavoro realizzato in serra con la specie *Brassica napus* (Javorská et al. 2011) che analizzando, dopo 75 giorni, la concentrazione dei congeneri PCB 28/52/101/118/138/153/181 nelle frazioni vegetali (radici, fusto e foglie) evidenzia come la fitoestrazione avvenga soprattutto a livello radicale, ma i congeneri con più atomi di cloro siano in proporzione più abbondanti nelle parti epigee.

Nelle sperimentazioni in cui un singolo congenere oppure una miscela di PCB sono stati addizionati artificialmente ad un suolo gli autori misurano quello specifico congenere, per esempio il PCB 5 (Li et al. 2011), o la miscela di congeneri usati (PCB 52, 77, 153; Meggo et al. 2013) o i congeneri tipici della miscela

commerciale addizionata, per esempio le diverse formulazioni Aroclor 1260 (misurazione dei congeneri PCB 52/47/56/123/153/141/138/183/180/170; Smith et al. 2007).

In un lavoro che non indaga la degradazione delle molecole bensì la capacità di fitoestrazione della pianta mediante la produzione di essudati radicali in grado di legare la diossina rendendola più idrofilica (Campanella et al. 2000) gli autori si concentrano su un unico composto, la 2,3,7,8 – tetraclorodibenzodiossina. In tale studio vengono impiegate le specie *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Daucus carota* e *Lycopersicum esculentum*.

In generale, le misurazioni di degradazione o fitoaccumulo più dettagliate sono condotte nelle sperimentazioni effettuate con suolo artificialmente contaminato dagli autori. Le pubblicazioni che riportano l'uso di suolo già inquinato da miscele di PCB includono sia casi con misurazioni più approssimative (Demrenova et al. 2005, Kurzawova et al. 2012) sia altri in cui le concentrazioni di molteplici congeneri vengono valutate. Si cita ad esempio il lavoro pubblicato da Li et al. (2013) usando le specie *Festuca arundinacea* e *Medicago sativa*, che misura la concentrazione di 42 congeneri al fine di determinare la concentrazione di PCB totale nel suolo prima e dopo la sperimentazione.

Ulteriori informazioni in merito alla degradazione di PCB nella letteratura analizzata sono incluse nei paragrafi 8 ("Metaboliti nel suolo e nelle piante") e 11 ("Emivita e/o degradation rate per i congeneri analizzati") di questo documento.

Per i dati riguardanti la letteratura sul pcdd-pcdf vedi paragrafi 1 e 2.

7. Capacità di fitoestrazione di mercurio e arsenico

(indicare quantità nel tempo: mg/m2/d o simili)

I lavori di letteratura analizzati e relativi a sperimentazioni di phytoremediation di suolo inquinato da PCB non indicano dati relativi alla capacità di fitoestrazione di metalli pesanti, quali mercurio ed arsenico. Generalmente tali indicazioni sono incluse in lavori scientifici che indagano in modo mirato la phytoremediation di siti inquinati da metalli pesanti. L'indagine bibliografica condotta ha confermato la difficoltà di reperire dati da sperimentazioni relative a situazioni simili a quella dell'area ex-Caffaro, confermandone la peculiarità.

Mercurio

Un'indagine bibliografica è stata dunque realizzata anche riguardo alle specie capaci di fitoestrarre mercurio con diverse specie vegetali. La felce *Pteris vittata* è stata coltivata somministrando alla pianta una soluzione fertilizzante N:P:K = 1:1:1 (Su et al. 2007) oppure una soluzione nutritiva Hoagland modificata. Gli autori osservano nel primo caso, realizzato con terriccio artificialmente inquinato mercurio (soluzione di $HgCl_2$), un accumulo del metallo nelle parti aeree dei controlli, probabilmente dovuto a fenomeni di assorbimento dall'atmosfera. Al contrario nel caso di *Pteris vittata* trattata con il fertilizzante N:P:K = 1:1:1 e cresciuta su suolo artificialmente inquinato con cristalli di $HgCl_2$, è stata riportata una variazione del contenuto di metallo da 85 a 413 mg/Kg (suolo), da 749 a 6802 mg/Kg (radici) e da 123 a 1469 mg/Kg (parte epigea).

Brassica juncea cresciuta in camera di crescita su suolo inquinato da metalli pesanti (arsenico e mercurio) ha mostrato la capacità di estrarre entrambi i metalli, in misura diversa per le differenti frazioni analizzate, come riportato di seguito. Radici: mercurio,1033 ± 439 mg/kg e arsenico, 61.5 ± 9.9 mg/kg. Parti aeree: mercurio 118 ± 10 mg/kg, e arsenico, 16.1 ± 2.6 mg/kg (Franchi et al. 2015). Nello stesso articolo si riporta

che la specie *Lupinus albus* ha mostrato le seguenti rese: radici: mercurio, 896 ± 33.4 mg/kg e arsenico, 14.0 ± 7.7 mg/kg. Parti aeree: mercurio 27.7 ± 6.0 mg/kg, e arsenico, 5.1 ± 1.2 mg/kg (Franchi et al. 2015).
Wang e coautori (2014) hanno evidenziato in un test in campo con *B. juncea* e *B. napus* che il trattamento con tiosolfato è affettivamente in grado di aumentare significativamente l'accumulo di mercurio in radici e germogli. Ciò rappresenta un'ulteriore indicazione del ruolo positivo di questo ammendante per i trattamenti di biostimolazione, come proposto da Franchi e collaboratori (2015) per *B. juncea e Lupinus albus*.
Le rese di estrazione riportate da Wang e collaboratori (2014) sono elencate di seguito per ciascuna varietà impiegata. *Brassica juncea* var.LDZY radici: 0.3±0.1 g/ha (controllo), 20±2 g/ha (tiosolfato); parti aeree: 1.4±0.2 g/ha (controllo), 133±17 g/ha (tiosolfato). *Brassica juncea* var.ASKYC radici: 0.04±0.002 g/ha (controllo), 3.6±0.5 g/ha (tiosolfato); parti aeree: 0.6±0.2 g/ha (controllo), 93±7 g/ha (tiosolfato). *Brassica napus* var. ZYYC radici: 0.2±0.1 g/ha (controllo), 9.7±1.7 g/ha (tiosolfato); parti aeree: 0.1±0.01 g/ha (controllo), 11.7±4 g/ha (tiosolfato). Il potenziale della specie *Brassica juncea* è confermato anche da altri autori (Su et al. 2007). Per la specie spontanea *Dittrichia viscosa* sono stati riportati valori di concentrazione di mercurio, nelle porzioni aeree, pari a 0,152 mg/kg, 0,667 mg/kg, 5,136 mg/kg (variabile nei tre siti inquinati analizzati nell'area oggetto di studio) (Shehu et al. 2014).
Li e coautori (2013b) hanno realizzato uno studio preliminare su 26 cultivar di riso per individuare quelle che accumulano un minor quantitativo di mercurio nei semi. Secondo i risultati di questo lavoro si ha una significativa differenza nella capacità di accumulare mercurio totale e metilmercurio in cultivar diverse, e in piante cresciute su suoli che mostrano livelli di inquinamento differenti. Le cultivar di riso scuro (brown) hanno capacità molto differenti in funzione che siano cultivar del gruppo *japonica* o meno, e gli autori affermano che è possibile coltivare determinate cultivar capaci di ridurre efficacemente l'accumulo di mercurio totale e metilmercurio nella granella pur crescendo in terreni molto inquinati. Il lavoro condotto su *Oryza sativa* conferma quanto osservato da altri autori in merito alla maggiore facilità di movimento, all'interno della pianta, del metilmercurio rispetto al mercurio inorganico (Li et al. 2013b). L'estrazione di mercurio, indicato come valore medio delle diverse cultivar, varia nelle piante di riso da sito a sito: (i) 26ng/g, Hg totale e 9,4 ng/g MeHg; (ii) 29 ng/g, Hg totale e 11 ng/g MeHg; (iii) 15 ng/g, Hg tot; 1,2 ng/g MeHg nell'area meno inquinata.

Arsenico

Le piante utilizzate per la phytoremediation dei metalli sono le cosidette piante iperaccumulatrici che riesco ad accumulare 100-1000 volte i livelli di metalli rispetto alle piante non iperaccumulatrici senza mostrare effetti sulla loro crescita. Il processo maggiormente utilizzato per la phytoremediation dei metalli è la fitoestrazione che consisite nell' accumulare i metalli dal suolo nelle radici e concentrarli nelle foglie. Una delle specie più efficienti per l' accumulo di As è *Pteris vittata* (*Lessl et al., 2014; Mandal et al., 2014; Chen et al., 2002; Wang et al., 2000*) che può tollerare concentrazioni di As nel suolo di 1500 µg/g (*Alagic et al., 2013*) grazie a dei meccanismi di detossificazione (complessazione e compartimentalizzazione). Si noti che il range di fitotossicità per l' As è tra i 5 e i 10 mg/kg su peso secco (*Alagic et al., 2013*). Essa può essere usata per la phytoremediation data la sua rapida crescita e elevata produzione di biomassa (*Lessl et al., 2014*). Anche *Betula pendula* è una specie che tollera elevate concentrazioni di metalli, ma in uno studio (*Alagic et al., 2013*) questa specie e anche *Tilia cordata* non si sono dimostrate delle piante iperaccumulatrici (BCF<1); una possibile causa è stata attirbuita al pH del suolo troppo elevato. Infatti il pH del suolo è un fattore molto importante in quanto influenza la solubilità e la biodisponibilità per le radici dell' As (più il pH è

acido, più mobilità e biodisponibilità sono favorite). Un' altra pianta accumulatrice di As è stata vista essere *Cicer arientinum* (*Srivastava et al. 2014*). In genere non cresce in condizioni da stress da metallo, ma se inoculata con alcuni batteri resistenti all' As, essi riescono a promuoverne la crescita. Questo tipo di trattamento può essere adottato per aumentare la fitostabilizzazione dell' As nelle radici e non tanto la fitoestrazione in quanto è stato notato che nel trattamento non inoculato l' accumulo nella parte aerea e nei frutti è ridotto. Anche *Ludwigia octovalvis* è un accumulatrice di As. *Titah et al., 2013* ha mostrato che addizionando fertilizzante NPK al terreno, l' efficienza di fitoestrazione dell' As è pari a quasi il 50% contro un 17.5% del controllo non addizionato di fertilizzate e un 8.8% della pianta inoculata con un consorzio di 6 batteri.

Kim et al., 2014 ha messo in evidenza come per sviluppare delle strategie di remediation adatte occorre conoscere la speciazione dell' As nel suolo, in quanto le varie forme di As hanno diversi gradi di biodisponibilità. Nel suolo l' As estite prevalentemente come arseniato (AsV) e diversi processi biochimici che avvengono nel suolo influenzano la mobilità dell' As, per questo la concentrazione totale dell' As nel suolo non è indicativa per l' accumulo da parte delle piante e occore valutare la sua biodisponibilità (*Lessl et al., 2014*). Soltanto le frazioni "soluble" e "exchangeable" sono disponibili per le piante, quindi per risanare effettivamente un suolo occore che anche le frazioni "non-labile" siano biodisponibili. Una strategia per mobilizzare le frazioni di As "non-labile" consiste nel far crescere la pianta in condizioni limitanti di fosforo (P) (*Lessl et al., 2014*), in quanto P e As hanno una struttura chimica analoga e quindi posso utilizzare lo stesso trasportatore di membrana per entrare nelle radici. La pianta non trovando P nel suolo fa entrare As, il quale diminuisce la sua concentrazione nelle frazioni "soluble" e "exchangeable" e questo crea un gradiente che sposta l' As dalla frazione "non-labile". Questo tipo di trattamento (crescita in condizioni di P limitante) ha anche un secondo beneficio: aumento della lunghezza/densità delle radici. Utilizzando questo tipo di trattamento è stato visto che *Pteris vittata* ha rimosso il 46-66% di As dal suolo in 3.5 anni.

Un' altra strategia per aumentare l'accumulo di As da parte delle piante consiste nell' applicare al suolo il fosfato in quanto si comporta in maniera simile all' arseniato: essi competono per i siti di accumulo del suolo e quindi il fosforo può sostituire l'arseniato fissato alla matrice del suolo (*Mandal et al., 2014; Titah et al., 2013*). L'efficienza di scambio tra arseniato e fosfato però dipende dalla tipologia di suolo (*Titah et al., 2013*).

8. Metaboliti di PCBs nel suolo e nelle piante

Esistono due distinti processi biologici in grado di trasformare i PCBs: processi aerobici ossidativi e processi anaerobici riduttivi. La declorinazione riduttiva (che avviene rimuovendo preferezialmente i clori in posizione meta e para) è responsabile della conversione dei PCBs alto clorurati in congeneri basso clorurati (orto) e quindi della riduzione dei congeneri diossina-simili (non-orto). I prodotti di questo processo anaerobico sono degradabili da una serie di batteri in condizioni aerobiche. Questi microorganismi, mediante il pathway della 2,3 diossigenasi convertono i PCB nei corrispettivi acidi clorobenzoici che a loro volta vengono degradati a CO_2 (*Abramowicz, 1995; Seeger et al., 2010*). Quindi mentre i congeneri basso clourati sono più facilmente degradabili, quelli alto clorurati sono potenzialmente biodegradabili da un sequenza di declorinazione riduttiva seguita da una mineralizzazione aerobica dei congeneri basso clorurati che sono venuti a formarsi (*Field et al., 2008*).

Diversi studi sono stati condotti per testare la capacità delle piante di metabolizzare i PCBs. E' stato visto che colture cellulari di radici di *Solanum nigrum* geneticamente modificate sono in grado trasformare tre monoclorobifenili (PCB2, PCB3, PCB4) in monidrossiclorobifenili e in diidrossiclorobifenili, mentre sei diclorobifenili (PCB4, PCB7, PCB8, PCB10, PCB11, PCB13) in diversi monoidrossidiclorobifenili (*Kucerova et al., 2000*). In un altro lavoro (*Rezek et al., 2007*) cellule della stessa specie sono state utilizzate per saggiare la loro capacità di metabolizzare 12 dicloro-, 7 tricloro-, 5 tetracloro- e 1 pentacloro- bifenili (PCB 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 28, 30, 31,38, 40, 52, 77, 80, 81 e 101). Il numero di metaboliti diminuiva all' aumentare dei numeri degli atomi di cloro e il grado di clorurazione del metabolita era lo stesso del composto di partenza. Metaboliti dei dicloro-PCB 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 erano i diclorobifeniloli. Nel caso del PCB9 i metaboliti principali erano 2',5'-dicloro-2-bifenilol e 2',5'-dicloro-3-bifenilol e 2',5'-dicloro-4-bifphenilol ed eccezionalmente anche due monocloro-bifeniloli. I triclo-PCBs hanno dato origine a triclorobifeniloli; metaboliti dei tetra e penta PCBs non sono stati trovati, fatta eccezione per il PCB77 (tetraclorobifenilolo). Colture cellulari di radici di *Nicotiana tabacum* invece sono state in grado di metabolizzare sei diclorobifenili (PCB4-9) in condizioni asettiche producendo tre tipi di metaboliti: idrossi-PCB, metossi-PCB, idrossi-metossi-PCB (Rezek et al., 2008).

E' stata inoltre investigata la capacità delle piante (*Populus deltoides x nigra*, DN34) di biotrasformare in maniera enantioselettiva i PCBs chirali (Zhai et al., 2011) coltivando la pianta in idroponica in presenza di due PCB chirali (PCB95 e PCB136) ed è stato visto che il PCB136 è più difficile da biotrasformare enantioselettivamente rispetto al PCB95.

Altri studi invece riportano i pathway degradativi di alcuni congeneri di PCB nel suolo (*Meggo et al., 2001*). Ad esempio: PCB52 può diventare PCB18 poi PCB9, che a sua volta diventa PCB1; PCB153 può diventare PCB101 poi PCB49 o PCB52 che a loro volta danno origine a PCB17 e PCB18 e poi PCB4 oppure può diventare PCB99 che a sua volta può dare PCB74 o PCB48 o PCB47 che diventano PCB28 o PCB29 o PCB31 o PCB18 o PCB17 fino a PCB4; PCB77 può diventare PCB37 o PCB35, il PCB37 poi da origine a PCB13 o PCB15 che diventano PCB3, mentre il PCB35 poi da origine a PCB11 o PCB12 che diventano PCB3.

I PCBs vengono metabolizzati anche negli animali (*Haraguchi et al., 2005*) dando origine a PCB fenolici e metilsulfonil-PCBs. In uomo i metaboliti di PCB che vengono trovati sono derivati metilati e composti alogenati fenolici (*Hovander et al., 2002*).

9. Tecniche adottate per ridurre la variabilità fra le repliche

Dei 60 lavori visionati (appartenenti alla cartella "Phyto e Rhizo" in bibliografia), solo alcuni (Low et al., 2010; Meggo et al., 2013; Liang et al., 2014 e, in piccola parte, Chen et al., 2014) riportano procedure di omogeneizzazione del suolo basate, implicitamente o esplicitamente, sulla Teoria di Gy: il materiale raccolto (eventualmente setacciato in precedenza, 60 mesh sieve) viene consolidato in un unico mucchio e poi quartato scavando (scooping) in maniera casuale dal mucchio originale. Ciascuno dei 4 quadranti viene miscelato manualmente prima di ricostituire un unico mucchio scavando a caso da ciascun quadrante fino

ad esaurimento. Tale procedura viene ripetuta un certo numero di volte (anche 30) e poi il suolo viene diviso in cinque cumuli allungati (0.2 x 1.5 m) secondo il metodo di campionamento "One-dimensional Japanese Slab-Cake". Questo consiste nel versare il campione secondo una linea usando almeno 20 diagonali (avanti e indietro) per distribuire le particelle del campione lungo la linea. Un cucchiaio di forma squadrata taglia la linea per rimuovere un'aliquota di sottocampione. Vengono poi combinate fra loro tante aliquote quante ne servono per ottenere una riduzione della massa. In seguito, i contenitori vengono riempiti usando un cucchiaio (scoop, a forma quadrata) a fondo piatto (per ridurre l'errore legato alla dimensione delle particelle) per raccogliere il suolo secondo uno schema diagonale lungo tutti e cinque i cumuli allungati (Low et al., 2010). Meggo et al. (2013), poi ripresi da Liang et al. (2014), omogeneizzano il suolo usando una tecnica di quartatura, che consiste nel dividere il suolo in quattro quadranti su un'apposita tela e nel creare venti traiettorie diagonali per miscelare insieme i componenti del suolo.
Più in generale la metodologia di campionamento incrementale (Incremental sampling methodology-ISM) (ITRC, 2012.), è quella che viene indicata, come riportato sopra, come la più indicata a ridurre la variabilità dei dati e ad aumentare la rappresentatività dei campioni. Tale metodologia si basa sulla Teoria di Gy, ovvero sulla più consolidata e matematicamente sviluppata teoria per il campionamento di materiale particolato, tradotta in inglese da Pitard nel 1993 e da questi estesa alle applicazioni ambientali.

Il campione (eventualmente essiccato e/o setacciato, se necessario, per ottenere particelle aventi dimensioni <2 mm) andrebbe sparso in un sottile strato su una superficie pulita (ad es. una teglia larga, usa e getta di alluminio).

I sottocampioni vengono preparati raccogliendo a caso 30 o più incrementi di suolo, ugualmente spaziati, e combinandoli fisicamente in un unico campione avente una massa totale >1 kg (USEPA SW-846 Method 8330B). Tipicamente, gli incrementi individuali di suolo pesano 20–60 g ed i campioni finali raccolti in campo pesano 500–2500 g. La seguente formula spiega come calcolare la massa di campione (per ulteriori informazioni sulla sua applicazione si rimanda al link: http://www.itrcweb.org/ISM-1/5_3_Field_Collection.html).

$$Ms = \rho \bullet n \bullet Ds \bullet \pi \bullet (\theta/2)^2$$

dove:

- ✓ Ms = massa del campione da ottenere (g);
- ✓ Ds = lunghezza dell'incremento (cm);
- ✓ n = numero di incrementi;
- ✓ ρ = densità di suolo o sedimenti (g/cm^3),
- ✓ θ = diametro della carota del campione (cm).

Solitamente, in campo non vengono pesati gli incrementi individuali, quindi si assume che una massa simile per incremento corrisponda ad un volume simile di suolo raccolto.

La scelta dello strumento di campionamento più appropriato dipende dalla coesione e dalla composizione del suolo. Per minimizzare una serie di errori, lo strumento dovrebbe permettere di ottenere incrementi cilindrici o a forma di carota di profondità costante. Il suo diametro dovrebbe essere almeno tre volte il

diametro (d) della particella più larga presente in una matrice grossolana (d ≥ 3 mm) e (3d + 10) mm nel caso di un materiale fine. L'obiettivo viene raggiunto usando uno strumento di campionamento (spatola) rettangolare a fondo piatto avente i lati verticali ed una larghezza (diametro) minimo di 16 mm

Picer et al. (2004), per omogeneizzare il suolo (scavato a 25 cm di profondità rispetto al top soil), suggeriscono di usare un mixer in cemento e di farlo girare per tre ore (dopo averlo privato di pietre e piante). La variabilità riscontrata (deviazione standard) fra le repliche fra i diversi congeneri oscilla fra il 10 ed il 30 %.

10. Tipo e numerosità delle matrici

La tipologia e la numerosità delle matrici analizzate nei lavori di letteratura varia in funzione del tipo di sperimentazione adottata. Per esempio, nel caso di esperimenti in vitro con colture di cellule vegetali (Mackova et al. 1997, Dudášová et al. 2012) una delle frazioni analizzate corrisponde al medium di coltura in cui sono state incubate le cellule. Nel caso di sperimentazioni comparabili a quella che si intende attuare per l'area ex-Caffaro, ovvero condizioni di serra e/o pieno campo, sebbene autori diversi abbiano analizzato matrici differenti, nella maggior parte dei lavori si lavora su suolo e tessuti vegetali.

La pianta, al termine dell'esperimento, viene generalmente suddivisa in due frazioni corrispondenti alla parte ipogea e epigea: questo è il tipo di frazionamento più comunemente applicato dalla letteratura studiata. In una referenza si riporta un differente approccio, in cui la porzione epigea viene ulteriormente separata. Piante di *Zea mays* ed *Heliantus annus* sono state separate in radici, fusto, foglie, semi (Kacálková et al. 2011) al termine di una sperimentazione in campo utilizzando suolo inquinato (1530 µg/kg PCBs totali; 0.138-3.42 mg/kg PAHs totali), e i risultati hanno indicato che la maggior parte dei contaminanti organici è stata trovata nelle radici, suggerendo che la fitoestrazione con queste specie vegetali non rappresenti un metodo utile di risanamento di suoli contaminati da POPs. Nel medesimo studio, la parte epigea viene separata in fusto e foglie per quanto riguarda le specie arboree. Qin e coautori (2014) analizzano, al contrario, solo due frazioni: la pianta intera e il suolo (senza frazionamenti), evidenziando che l'estrazione da parte delle piante *Cucumis sativus* e *Cucurbita* spp. è minima e la biodegradazione avviene nel suolo. Le frazioni del tessuto vegetale possono essere riferite alla singola pianta oppure a pool di piante che includono 3 o 5 individui. Questo approccio è sempre usato per *Medicago sativa* (Teng et al. 2010, Tu et al. 2011, Xu et al. 2010) ma riportato anche per *Cucurbita pepo* (Whitfield et al. 2008).

Le informazioni reperite dalla letteratura riguardo alla matrice suolo non indicano, in molte pubblicazioni, dettagli in merito a frazionamenti (per esempio Dzantor et al. 2001, Kurzakova et al. 2012). Viceversa alcuni autori riportano informazioni inerenti alla separazione delle diverse frazioni di suolo, indicando di avere effettuato le analisi chimiche e microbiologiche sulla rizosfera (la frazione di suolo strettamente adesa alle radici), oppure sul suolo circostante le radici (soil surrounding root, SSR) e sul suolo libero non influenzato dagli essudati radicali (bulk). Chen e coautori (2014) analizzano le frazioni rizosfera che suolo libero di *Oryza sativa* cresciuta in condizioni di serra. Anche i lavori pubblicati da Teng et al. (2010) e Xu et al. (2010) si riferiscono in modo più chiaro alla rizosfera quando indicano la porzione di suolo analizzata da piante di *M. sativa*. In una pubblicazione gli autori hanno usato il termine "root zone" per definire la porzione di suolo che sta a 20–40 cm di profondità, campionati da specie arboree (*Salix caprea, Pinus nigra*) che crescevano su

un suolo inquinato da PCB (15 mg/Kg) per studiare la loro influenza sui microrganismi, degradatori e non, nel suolo (Leigh et al. 2006).

Nel caso di crescita in vaso tuttavia è molto probabile che l'intera quantità di suolo venga interessata dalla crescita radicale, rendendo di fatto impossibile riconoscere una porzione di suolo libero nel vaso stesso. In una sperimentazione condotta in microcosmi Li e coautori (2011) considerano infatti, dopo la rimozione delle radici, il suolo totale presente in microcosmi allestiti con 1 Kg di suolo artificialmente inquinato da PCB come un'unica frazione. L'analisi di un'unica frazione di suolo dopo la omogeneizzazione dell'intero vaso, è applicata anche in una sperimentazione in serra, effettuata con *Lolium perenne* inoculato con il fungo micorrizico arbuscolare *Glomus caledoniun* e/o lombrichi della specie *Eisenia foetida* (Lu et al. 2014). I risultati di questo lavoro indicano che *L. perenne* aumenta la rimozione di PCB nel suolo, attribuendo un effetto sinergico a *Glomus caledoniun* e *Eisenia foetida*.

Le sperimentazioni condotte per la fitoestrazione di mercurio riportano lo studio della concentrazione del metallo nel suolo (suolo libero o rizosfera) e nella pianta (separata in due frazioni, ipogea ed epigea). Lo studio condotto su *Oryza sativa* per valutare l'accumulo di mercurio nei semi invece analizza solo quest'ultima frazione vegetale (Li et al. 2013b).

Per quanto riguarda l' arsenico vengono in genere analizzate le seguenti parti: suolo, radici, foglie. Solo in un caso frutto e buccia del frutto (Srivastava et al., 2014).

Infine, solo una pubblicazione riferisce di avere misurato i livelli di PCB nell'aria durante una prova di campo (Whitfield Åslund 2007).

11. Emivita e/o degradation rate per i congeneri analizzati

(HL (giorni); Degradation rate (h-1))

I risultati riguardanti il rate di degradazione o l' emività delle molecole in esame vengono generalmente riportati negli articoli come percentuale di riduzione della concentrazione nel suolo nel tempo. Da questo dato è possibile risalire al rate di degradazione mediante la seguente formula:

$$K_D = -\frac{\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right)}{t}$$

Dove K_D: rate di degradazione (h^{-1}), C_0: concentrazione iniziale nel suolo (mg/kg) , C_t: concentrazione finale nel suolo al tempo t (mg/kg), t: durata dell' esperimento (h).

Dal rate di degrazione si può ricavare l' emivita dalla seguente formula:

$$HL = \frac{0.693}{K_D}$$

Dove HL: emivita (h)

Su circa 80 articoli consultati, soltato 24 riportano dei dati da cui è possibile derivare valori di rate di degradazione o emivita. Le specie di piante utilizzate in questi lavori sono riassunti in **Tabella 2** nella quale vengono indicati il numero di articoli in cui la specie è stata utilizzata insieme ad altre informazioni importanti

(suolo contaminato o spiked, esperimento effettuato in campo, serra, camera di crescia o microcosmo, tipo di trattamento, miscela di contaminanti o singoli congeneri) che permettono di confrontare i vari studi. Come si può vedere sono pochi gli studi che presentano dati relativi a singoli congeneri rispetto a quelli in cui vengono considerate le miscele; inoltre queste miscele sono in genere basso clorurate al contrario di quanto sappiamo per il Fenclor DK che caratterizza il SIN Brescia Caffaro. Per quanto riguarda la tipologia di suolo, prevalgono gli studi con suolo spiked (in cui la molecola è più biodisponibile) rispetto a quelli con suoli caratterizzati da una contaminazione vecchia. Se si considera la tipologia di esperimento, una buona parte di studi è stata condotta in vaso in serra, ma ci sono anche studi svolti in camere di crescita, mesocosmi e qualche studio di campo. Infine una buona parte dei lavori è stata condotta utilizzando solo le piante come unico trattamento, mentre lavori in cui sono stati utilizzati anche batteri e funghi sono in minor quantità; vi sono poi degli altri tipi di trattamenti da tenere in considerazione come cicli redox, aggiunta di ammendanti, nutrienti e lombrichi.

Di seguito i risultati verrano presentati innanzitutto divisi per tipologia di contaminanti (PCBs e PCDD/F) facendo una distinzione fra studi riguardanti miscele e quelli che considerano singoli congeneri. Inoltre opportuni sottocapitoli verrano dedicati alle varie tipologie di trattamento utilizzati in modo tale da facilitare il confronto fra gli studi. Infine in **Tabella 3** verranno riassunti i range di valori di emivita calcolati a partire dalle informazioni degli articoli presi in esame.

11.1. Policlorobifenili (PCB)

Diversi lavori forniscono la percentuale di riduzione di PCB totali nel suolo, alcune volte specificando i congeneri considerati (*Liang et al., 2014*; *Li et al., 2013; Meggo et al., 2013a; Javorska et al., 2009; Teng et al., 2010; Tu et al., 2011b; Meggo et al., 2013b; Slater et al., 2011)* o la miscela di congeneri (Aroclor 1242, Aroclor 1248, Delor 103, Delor 106 etc.) (*Checkol et al., 2004; Singer et al., 2013; Dzantor et al., 2000; Dzantor et al., 2000; Qin et al., 2014a; Qin et al., 2014b; Mackova et al., 2009*), altre volte invece non specificando la composizione (*Kurzavowa et al.,2012; Chen et al., 2014a; Chen et al., 2014b; Ionuscu et al., 2009; Lu et al., 2014)*.

11.1.1 PCB totali e miscele

11.1.1.1 Solo pianta

Checkol et al., 2004 hanno dimostrato che 3 piante leguminose (*Medicago sativa, Lathyrus sylvestris, Lespedera cuneata*) e 4 piante erbacee (*Panicum clandestinum, Festuca arundinacea, Panicum virgatum e Phalaris arundinacea*) (esperimento in camera di crescita, suolo spiked) hanno ridotto la concentrazione di Aroclor 1248 di circa il 70% in 120 giorni (**emivita: 2/3 mesi**). In un' altro studio (Li et al., 2013) *Medicago sativa* e *Festuca arundinacea* (esperimento in serra in vaso, suolo contaminato hanno ridotto la concentrazione di PCB totali (18, 16/32, 31, 28/33, 22, 45, 52, 47/48/49, 37/42/44, 41/64, 40, 74, 66/70, 56/60, 101, 99, 83, 97, 87, 85/136, 110, 82, 108/118/149, 146/153, 129/138, 175, 177,180) del 40% e 31% rispettivamente e del 33% se co-coltivate in 150 giorni (**emivita di 7, 9 e 9 mesi rispettivamente**). *Dzantor et al., 2000* hanno invece dimostrato, conducendo un esperimento di 180 giorni in serra in vaso, che *Phalaris arundinacea*, *Panicum variegatum*, *Lathyrus sylvestris* sono in grado di rimuovere il 59%, 52% e 49% di PCB rispettivamente (PCB totali, Aroclor 1248) pari a un **emivita di 5-6 mesi** e questa differenza è statisticamente significativa rispetto al controllo non piantato e ai trattamenti piantati con *Medicago sativa* e

Coronilla varia che riducono la concentrazione solo dell' 8 % e 17% (**emivita di 4 e 2 anni**); *Lespedeza cuneata*, *Festuca arundinacea* e *Panicum clandestinum* invece hanno ridotto la concentrazione del 36%, 32% e 30% (**emivita 9, 11 e 12 mesi**). *Ionescu et al*., 2009 hanno visto che *Nicotiana tabacum*, *Solanum nigrum*, *Armoracia rusticana* e *Salix caprea* dopo 6 mesi di esperimento con suolo contaminato in vaso, riducono la concentrazione di 0%, 9.3%, 28% e 31.8% rispetto al controllo non piantato in cui la concetrazione si riduce del 17.9% **(emivite 1-4 anni**). *Javorska et al., 2009* hanno dimostrato che *Brassica napus* riesce in 75 giorni a rimuovere l'8% e il 15% di PCB (**emivita 21 e 11 mesi**) in due suoli con contenuto di materia organica diverso e che la concentrazone di PCB è più bassa nel suolo della rizosfera (riduzione di circa 20% in suolo con contenuto di carbonio organico minore). Diverse piante appartenenti alla famiglia delle Cucurbitacee (*Qin et al., 2014b*) sono state viste essere in grado di ridurre la concentrazione di PCB totali nel suolo (Aroclor, 1242/1254) in 60 giorni (esperimento in serra con suolo contaminato) del 43% (*Cucurbita pepo*), 41% (*Cucurbita moscata*), 26% (*Cucurbita maxima*) e 21% (*Cucurbita sativus*) (**emivita 2-6 mesi**). *Tu et al., 2011b*, hanno invece dimostrato che *Medicago sativa* è in grado di rimuovere in 2 anni il 78.4% di PCB (suolo contaminato in vaso) pari a un emivita di **11 mesi** contro quasi 4 anni del controllo non piantato. *Mackova et al., 2009* hanno dimostrato che *Nicotiana tabacum*, *Solanum nigrum*, *Medicago sativa* sono in grado di rimuovere in 150 giorni rispettivamente il 24%, 22%, 15% della concentrazione totale di PCB (Delor 103/106) pari a un emivita di **13 - 21 mesi** contro 37 mesi del non piantato (esperimento in campo); mentre lo stesso esperimento condotto qualche anno dopo con lo stesso suolo ma in vaso ha dato i seguenti risultati espressi come percentuale di rimozione: *Nicotiana tabacum* (30.5%), *Solanum nigrum* (19.8%), *Medicago sativa* (17.1%), *Armoracia rusticana* (27.8%) rispetto al 14.8% del non piantato.

11.1.1.2 Pianta e batteri

E' stato visto che *Brassica nigra* (esperimento in serra in colonne di PCV, suolo spiked) (*Singer et al., 2003*) è in grado, se bioaugmentata con *Ralstonia euthropha* e *Rhodococcus* spp, di ridurre la concentrazione di PCB totali (Aroclor 1242) del 43% in 66 giorni (**emivita: 3 mesi**) (come trattamento con solo pianta e minimal salts medium). *Kurzavowa et al., 2012* hanno dimostrato che *Solanum nigrum* e *Nicotiana tabacum* riescono a rimuovere rispettivamente il 45% (**emivita 3 mesi**) e il 25% (**emivita 7 mesi**) di PCB totali del suolo in 90 giorni, mentre se bioaugmentate rispettivamente con *Ochrobactrum* sp KH6 e *Pseudomonas* sp L15, le percentuali di riduzione diventano 47% (**emivita 3 mesi**) e 53% (**emivita 3 mesi**) (esperimento in microcosmo, suolo contaminato).

11.1.1.3 Pianta e funghi

Altri studi sono stati effettuati inoculando funghi (che formano micorrize) invece che batteri. Ad esempio è stato visto (*Qin et al., 2014a*) che *Cucurbita pepo*, se micorrizata da *Acaulospora laevis* è in grado di rimuovere il 66.3% in 60 giorni (**emivita 2 mesi**) di PCB totali (Aroclor 1242) dal suolo della rizosefera, rispetto a un 45% del controllo non micorrizzato (esperimento in serra in vaso con suolo spiked) e la rimozione è maggiore nel suolo della rizosfera rispetto che al suolo bulk. *Teng et al., 2010* invece ha dimostrato che utilizzando *Medicago sativa* micorrizata con *Glomus caledonium*, la concentrazione di PCB nel suolo (mix 21 PCB, suolo contaminato in campo), viene ridotta del 12% in 180 giorni (**emivita 3 anni**) (quasi come controllo non micorrizzato), mentre se oltre al fungo viene anche inoculato *Rhizobium melioliti* la percentuale aumenta a 43.5% (**emivita 7 mesi**) (quasi come *Rhizobium* da solo). *Lolium multiflorum (Lu et*

al., 2014), se micorrizata da *Glomus caledonium* e aggiungendo il lombrico *Eisenia foetida* al terreno riesce a ridurre in 180 giorni la concentrazione di 21 PCB nel suolo del 79.5% (**emivita 3 mesi**) contro il 58.4% del solo piantato. Notare che facendo il bilancio di massa risulta che la principale perdita è dovuta alla biodegradazione (32% nel controllo, fino a 72.9% in trattato con fungo e lombrico); quello che si trova in lombrico e pianta è solo una minima parte.

11.1.1.4 Pianta e altri trattamenti

In alcuni studi (*Chen et al., 2014a*) sono stati determinati i PCB totali in tre comparti (suolo della rizosfera, suolo della non rizosfera e suolo superficiale (all'interfaccia suolo-acqua) utilizzando come pianta *Oryza sativa* sottoponendola a cicli redox (allagamento/drenaggio), dimostrando che la concentrazione di PCB viene ridotta di circa il 45% in 300 giorni in tutti i comparti (**emivita 12 mesi**); sembra però che il suolo della rizosfera diminuisca in concetrazione più velocemente rispetto al suolo bulk. *Chen et al., 2014b* invece sempre utilizzando dei cicli redox (allagamento/drenaggio) hanno dimostrato che la concentrazione di PCB diminuisce di circa il 40% (**emivita di 11 mesi**) in 240 giorni sia nel trattamento piantato con *Oryza sativa* che nel non piantato e la differenza è statisticamente significativa rispetto al non piantato in condizioni dry.

Dzantor et al., 2001 ha condotto un esperimento con diverse piante (*Lathyrus sylvestris*, *Phalaris arundinacea*, *Medicago polymorpha*) e ha testato la loro capacità di ridurre la concentrazione di PCB totali nel suolo (Aroclor 1248) aggiungendo al suolo degli ammendanti (aghi di pino, bifenile, bucce di arancio) mostrando che dopo 100 giorni il trattamento piantato ma senza ammendanti riduceva la concentrazione di PCB di più rispetto al controllo non piantato e senza ammendanti, ma la differenza non era statisticamente significativa; il trattamento non piantato con aggiunta di bucce di arancio sembra mostrare i risultati migliori, ma anche in questo caso non c'è differenza statisticamente significativa se confrontato al non piantato addizionato di aghi di pino o bifenile. Per ogni tipo di pianta le percentuali di riduzione di PCB non differiscono in maniera statisticamente significativa rispetto all' ammendante aggiunto (fa eccezione la combinazione *Medicago sativa* + bifenile che riduce la concentrazione solo del 20%, mentre in genere la riduzione va da 31.4% a 59% (**emivita 3 - 6 mesi**)).

11.1.2 Singoli congeneri

Solo pochi studi riportano dati in merito alla degradazione di singoli congeneri (*Smith et al., 2007; Meggo et al., 2013a; Secher et al., 2013; Liang et al., 2014; Meggo et al., 2013b; Slater et al., 2011*). Informazioni che si traggo da questi studi, oltre alla percentuale di riduzione della concentrazione nel tempo, sono le seguenti:

- la degradazione è favorita per i congeneri basso clorurati rispetto a quelli alto clorurari;
- la degradazione di congeneri alto clorurati è favorita in condizioni riduttive (*Meggo et al., 2013a*);
- la degradazione in condizioni riduttive da parte dei microrganismi avviene prima rimuovendo i sostituenti in meta e in para (PCB180 può quindi diventare PCB153 e PCB138, PCB 123 viene degradato poco (*Smith et al. 2007; Secher et al.,2013*); PCB52 può diventare PCB18 poi PCB9, poi PCB1; PCB153 può diventare PCB101 poi PCB49 o PCB52 che a loro volta danno origine a PCB17 e PCB18 e poi PCB4 oppure può diventare PCB99 che a sua volta può dare PCB74 o PCB48 o PCB47 che diventano PCB28 o PCB29 o PCB31 o PCB18 o PCB17 fino a PCB4; PCB77 può

diventare PCB37 o PCB35, il PCB37 poi da origine a PCB13 o PCB15 che diventano PCB3, mentre il PCB35 poi da origine a PCB11 o PCB12 che diventano PCB3 (*Meggo et al., 2011b*).

11.1.2.1 Pianta e batteri

E' stato visto che *Panicum virgatum* riesce a rimuovere il 16.7% (**emivita 21 mesi**), 7.9% (**emivita 47 mesi**) e 9.6% (**emivita 38 mesi**) in 168 giorni di PCB52, PCB77 e PCB153 (ma per PCB77 e PCB153 questa riduzione non è statisitcamente significativa rispetto al controllo non piantato). Se la pianta viene bioaugmentata con *Burkholderia xerovorans* LB400 è in grado di rimuovere in 168 giorni il 42% di PCB52 (**emivita 7 mesi**) e il 13% di PCB153 (**emivita 28 mesi**)(*Liang et al., 2014*) (esperimento in microcosmo, suolo spiked e aged per 2 mesi). *Secher et al., 2013* invece hanno dimostrato, utilizzando *Festuca arundinacea* che non c'è una differenza significativa nel rimuovere i PCB dal suolo tra trattamento con solo pianta e trattamento con pianta bioaugmentata con *Burkholderia xerovorans* LB400. Il grado di rimozione è però diverso per i vari congeneri: diminuisce all' aumentare del numero di clori (PCB28: ~60%, **emivita 2 mesi**; PCB52: ~30%, **emivita 5 mesi**; PCB101: ~45%, **emivita 3 mesi**; PCB 118: ~30%, **emivita 5 mesi**; PCB153: ~15%, **emivita 9 mesi**; PCB180: ~30%, **emivita 5 mesi** (esperimento in camera di crescita, 70 giorni, suolo contaminato).

11.1.2.2 Pianta e altri trattamenti

Panicum virgatum riesce a rimuovere il 56% (**emivita 6 mesi**), 48% (**emivita 8 mesi**), 53% (**emivita 7 mesi**) di PCB52, PCB77 e PCB153 in 224 giorni se viene sottoposte a cicli redox (allagamento/drenaggio) (*Meggo et al., 2013a*) e risultati simili e nelle stesso condizioni sono stati visti anche per *Populus deltoids x nigra* DN34 (esperimento in microcosmo, suolo spiked e aged). *Meggo et al., 2013b* hanno dimostrato che *Panicum virgatum* e *Populus deltoids x nigra* DN34 se sottoposti a cicli redox (allegamento/drenaggio) sono in grado di ridurre in 224 giorni la concentrazione di PCB52, PCB77 e PCB153 (sia se addizionati al terreno come miscela sia come singoli congeneri) di circa il 50% (**emivita circa 6 mesi**), contro circa un 30% del controllo non piantato (emivita 15 mesi).

Slater et al., 2011 hanno invece visto che addizionando radici fini in vasi piantati con *Picea glauca* e *Salix alaxensis* (specie native) esse riescono in 180 giorni a ridurre la concentrazione di PCB8 del 44% e 66% (**emivita 7 e 4 mesi**), PCB18 del 11% e 33% (**emivita 36 e 10 mesi**), PCB77 del 22% e 48% (**emivita 17 e 6 mesi**) ma le differenze per il pino non sono statisticamente significative rispetto al controllo non piantato, mentre la concentrazione di PCB153, PCB105, PCB169 non viene ridotta rispetto al controllo non piantato (esperimento in con suolo spike in microcosmo).

11.1.3 Effetti non osservati

Altri studi invece non dimostrano una riduzione significativa della concentrazione di PCB nel suolo nel tempo (*Whitfield et al., 2007; Low et al., 2010; Ficko et al., 2011a; Ficko et al., 2011b; Whitfield et al., 2008)* sostenendo che occorrono diversi stagioni vegetative affinchè si possano apprezzare delle riduzioni significative (suolo contaminato storicamente e invecchiato è eterogeneo dal punto di vista delle concentrazioni nonostante gli sforzi di omogenizzazione prima della sperimentazione) e che probabilmente

utilizzando dei vasi più grandi la biomassa radicale delle piante potrebbe svilupparsi meglio ottenendo migliori risultati.

11.1.4 Co-colture

Al contrario di *Li et al., 2013*, *Whitfield et al., 2007* sostengono che una co-coltura di *Cucurbita pepo*, *Festuca arundinacea* e *Carex normalis* potrebbe dare migliori risultati rispetto che alle colture singole.

11.1.5 Tipologia di suolo

Altri studi mettono in evidenza come la tipologia di suolo (contenuto di materia organica) può influire sulla capacità di una stessa pianta di rimuovere i PCB dal suolo (*Javorska et al., 2009*), cioè una stessa pianta messa in due suoli con livello di contaminazione simile, ma con contenuto di materia organica differente dimostrano un' efficienza diversa nel ridurre la concentrazione di PCB da suolo.

11.1.4 Altro

Un numero minore di studi riguardano invece test in vitro con colture vegetali o batteriche (*Leigh et al., 2006; Mackova et al., 1997; Kucerova et al., 2000; Gilbert et al., 1997; Fletcher et al., 1987*) o in idroponica (*Chu et al., 2006; Toussaint et al, 2012*) quindi non confrontabili con la situazione di campo e serra o piante transgeniche (*Kurzawova et al. 2012*). Alcuni studi vengono condotti solo per saggiare la capacità degradativa dei batteri (non in vitro) (*Gilbert et al*., 1997; *Correa et al., 2010*; *Murinova et al., 2014*; *Toussaint et al., 2012*; *Tu et al., 2011a*) oppure di funghi (*Hong et al*., 2012*; Federici et al*., 2012) senza la presenza di piante.

11.2. Diossine e Furani (PCDD/PCDF)

Solo due lavori (Wang and Oyaizu, 2009; Wang and Oyaizu, 2011) riportano informazioni in merito alla percentuale di rimozione di diossine e furani dal suolo; tuttavia non per gli stessi congeneri che caratterizzano il SIN Brescia Caffaro. *Wang and Oyaizu,.2009* hanno dimostrato che *Trifolium repens* in terreno non sterile è in grado in 60 giorni di rimuovere il 70% della concentrazione di dibenzofurano non clorurato (emivita 35 giorni), contro il 30% in terreno sterile (esperimento in camera di crescita con suolo spiked). Wang and Oyaizu,.2011 hanno invece dimostrato che *Trifolium repens* se inoculato con *Commomonas* KD7 è in grado di rimuovere in 84 giorni l' 87%, il 57%, 53%, 76%, 69%, 21%, 66%, 56% di DF, 2,8 DCDF, 2,4,8 TCDF, DD, 1-CDD, 2,7-DCDD, 1,2,4-TCDD, 1,2,3,4-TCDD pari a un **emivita di 1-8 mesi**. Le percentuali si abbassano se viene utilizzata solo la pianta non inoculata (15-23%, **emivita 7-12 mesi**).

Tabella 2- Elenco specie utilizzate nei lavori che riportano informazioni in merito all'emivita (*nutrienti, ammendanti, cicli redox, lombrichi)

Specie	n° totale articoli	Tipo di suolo		Luogo				Trattamento				Contaminanti	
		spiked	contaminato	Campo	Serra	Camera di crescita	Microcosmo	Solo pianta	Pianta + B	Pianta + F	Pianta + altro*	Miscele	Singoli congeneri
Medicago sativa	**6**	xx	xxxx	xx	xxxx	x		xxxx	x	x	x	xxxxx	
Panicum virgatum	**4**	xxxx			x	xx	xx	xxxx	x		xx	xxx	xxx
Festuca arundinacea	**4**	xx	xx		xx	xx		xxx	x		x	xxx	x
Solanum nigrum	**3**	x	xxx	x	xxx		x	xxxx	x			xxxxx	
Nicotiana tabacum	**3**	x	xx	x	xx		x	xxx	x			xxx	
Lathyrus sylvestris	**3**	xxx			x	x	x	xxx			x	xxx	
Phalaris arundinacea	**3**	xxx			x	x	x	xxx			x	xxx	
Lespedera cuneata	**2**	xx			x	x		xx				xx	
Panicum clandestinum	**2**	xx			x	x		xx				xx	
Populus deltoids x nigra DN34	**2**	xx				x	x	xx			xx	xx	xx
Oryza sativa	**2**		xx		xx			xx			xx	xx	
Cucurbita pepo	**2**	x	x		xx			xx		x		xx	
Armoracia rusticana	**2**		xx		xx			xx				xx	
Brassica nigra	**1**	x					x	x	x		x	x	
Carex aquatalis	**1**	x			x			x			x		x
Spartina pectinata	**1**	x			x			x			x		x
Tripsacum dactyloidetes	**1**	x			x			x			x		x
Morus rubra	**1**	x			x			x			x		x
Scirpus fluvialis	**1**	x			x			x			x		x
Coronilla vari	**1**	x			x			x				x	
Medicago polymorpha	**1**	x					x	x			x	x	
Salix caprea	**1**		x		x			x				x	
Brassica napus	**1**		x		x			x			x		
Cucurbita moscata	**1**		x		x			x		x		x	
Cucurbita maxima	**1**		x		x			x		x		x	
Cucumis sativus	**1**		x		x			x				x	
Lolium perenne	**1**		x		x					x	x	x	
Salix alaxensis	**1**	x					x	x			x		x
Panicum variegatum	**1**	x			x			x				x	
Picea glauca	**1**	x					x	x			x		x

Tabella 3 - Range di emivite calcolate per gli studi condotti utilizzando solo pianta, pianta + batteri, pianta + funghi

Trattamento	Contaminante	Emivita (mesi)
Solo pianta	PCB28	2
	PCB52	2-21
	PCB77	7-47
	PCB101	2
	PCB118	5
	PCB153	7-38
	PCB180	4
	Aroclor 1242	2
	Aroclor 1242/1254	2-6
	Aroclor 1248	2-50
	Delor 103/106	8-56
	PCB tot	3-192
Pianta + batteri	PCB28	2
	PCB52	6-7
	PCB77	28
	PCB101	3
	PCB118	10
	PCB153	10
	PCB180	15
	Aroclor 1242	3
	Aroclor 1248	3-8
	PCB tot	3-8
Pianta + funghi	Aroclor 1242	1-7
	PCB tot	7-33

12. Fitossicità

Molti dei dati sotto riportati vengono da un rapporto creato per il U.S. Department of Energy (Efroymson et al, 1997). In tale rapporto è presente una review estensiva dei dati di fitotossicità disponibili e vengono indicati degli “screening benchmarks”, ovvero soglie oltre le quali possono essere evidenziati danni. Questi valori vanno presi come punti di riferimento e non come valori assoluti perchè la disponibilità delle molecole o degli elementi dipende non solo dalla concentrazione riporatta ma anche dalla quantità e forma di carbonio organico, dalla longevità della contaminazione e dalla specie chimica presente, nel caso degli inorganici.

PCB

In letteratura vengono riportati effetti fitotossici di PCBs a lvelli di concentrazione molto alti (superiori alle decine di mg/kg). In Efroymson et al, (1997) viene riportato che a 1000 mg/kg di Aroclor 1254 non venono riportati effetti sulla crescita (altezza, uso dell’acqua e peso fresco) su mais, sorgo e festuca. La soia riportava riduzioni di peso fresco del 28% per l’uso dell’acqua e del 43% sulla crescitaPer i PCB occorre sottolineare che non sono disponibili dati per i singoli congeneri ma come “PCB totali”, ovvero riferiti ad Aroclor. Per i PCB lo screening benchmark per il suolo è 40 mg/kg.

Diossine e Furani

In Efroymson et al, (1997) non è disponibile un dato di benchmark per diossine e furani. Hanano et al (2014) hanno mostrato effetti di riduzione della germinazione di Arabidopsis thaliana (che passava dal 98% a 0 ng/l a 82 % con 100 ng/l) di 2,3,7,8- TCDD, mentre la sopravvivenza passava dal 99% al 85 %. Il peso fresco della plantula veniva ridotto da 3.2 g (0 ng/L) 9 a 1.9 g (a 100 ng/L), pari a cica il 59% di riduzione della crescita. Gli autori mostrano che la pianto è in grado di concentrarre TCDD anche nella parte aerea. Tuttavia, l’esperimento viene effettuato in piastra e la molecola è in acqua, ovvero massimizzando la biodisponibilità. Si ritiene quindi che in condizioni di suolo, ovvero in presenza di carbonio organico, tali concentrazioni disponibili equivalgano a diversi ordini di grandezza maggiore di concentrazione nel suolo. In un recente lavoro (Liu et al., 2015) mostrano gli effetti di 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-para-dioxin (PeCDD) sulla crescita del mung bean (fagiolo indiano), che sembrano aumentare la crescita (peso fresco) del12% fino a concentrazioni di 10 ng/kg, mentre diminuiscono del 10% a concentrazioni di 30 ng/kg.

Arsenico

In Efroymson et al, (1997) è disponibile un dato di benchmark, pari a 10 mg/kg. Non viene indicata però la specie chimica. Anche per i suolo Caffaro non è noto il dato di concentrazione delle varie specie ma solo il dato di arsenico totale. Per tale motivo il dato di fitotossicità andrà considerato come indicativo.

Mercurio

In Efroymson et al, (1997) è disponibile un dato di benchmark, pari a 0.3 mg/kg. . Non viene indicata però la specie chimica. Anche per i suolo Caffaro non è noto il dato di concentrazione delle varie specie ma solo il dato di mercurio totale. Per tale motivo il dato di fitotossicità andrà considerato come indicativo.

Bibliografia

Abdolahpur Monikh, F., Karami, O., Hosseini, M., Karami, N., Bastami, A.A., and Ghasemi, A.F. (2013). The effect of primary producers of experimental aquatic food chains on mercury and PCB153 biomagnification. Ecotoxicology and Environmental Safety *94*, 112–115.

Abramowicz, D.A. (1995). Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment. Environ. Health Perspect. *103 Suppl 5*, 97–99.

Alagić, S.Č., Šerbula, S.S., Tošić, S.B., Pavlović, A.N., and Petrović, J.V. (2013). Bioaccumulation of Arsenic and Cadmium in Birch and Lime from the Bor Region. Archives of Environmental Contamination and Toxicology *65*, 671–682.

Ali, H., Khan, E., and Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. Chemosphere *91*, 869–881.

Alkorta, I., and Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of organic contaminants in soils. Bioresource Technology *79*, 273–276.

Anyasi, R.O., and Atagana, H.I. (2011). Biological remediation of polychlorinated biphenyls (PCB) in the environment by microorganisms and plants. AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY *10*.

Bonanno, G. (2011). Trace element accumulation and distribution in the organs of Phragmites australis (common reed) and biomonitoring applications. Ecotoxicology and Environmental Safety *74*, 1057–1064.

Bonanno, G. (2012). Arundo donax as a potential biomonitor of trace element contamination in water and sediment. Ecotoxicology and Environmental Safety *80*, 20–27.

Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J., and Gallardo, S. (2005). Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. Process Biochemistry *40*, 1999–2013.

Campanella, B.F., Bock, C., and Schröder, P. (2002). Phytoremediation to increase the degradation of PCBs and PCDD/Fs. Environ. Sci. & Pollut. Res *9*, 73–85.

Campanella, B., and Paul, R. (2000). Presence, in the Rhizosphere and Leaf Extracts of Zucchini (Cucurbita pepo L.) and Melon (Cucumis melo L.), of Molecules Capable of Increasing the Apparent Aqueous Solubility of Hydrophobic Pollutants. International Journal of Phytoremediation 2, 145–158.

Chekol, T., Vough, L.R., and Chaney, R.L. (2004). Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils: the rhizosphere effect. Environment International *30*, 799–804.

Chen, C., Yang, K., Yu, C., Huang, R., Chen, X., Tang, X., Shen, C., Hashmi, M.Z., and Shi, H. (2014a). Influence of redox conditions on the microbial degradation of polychlorinated biphenyls in different niches of rice paddy fields. Soil Biology and Biochemistry *78*, 307–315.

Chen, C., Yu, C., Shen, C., Tang, X., Qin, Z., Yang, K., Hashmi, M.Z., Huang, R., and Shi, H. (2014b). Paddy field – A natural sequential anaerobic–aerobic bioreactor for polychlorinated biphenyls transformation. Environmental Pollution *190*, 43–50.

Chen, T., Wei, C., Huang, Z., Huang, Q., Lu, Q., and Fan, Z. (2002). Arsenic hyperaccumulator Pteris Vittata L. and its arsenic accumulation. Chin. Sci. Bull. *47*, 902–905.

Correa, P.A., Lin, L., Just, C.L., Hu, D., Hornbuckle, K.C., Schnoor, J.L., and Van Aken, B. (2010). The effects of individual PCB congeners on the soil bacterial community structure and the abundance of biphenyl dioxygenase genes. Environment International *36*, 901–906.

De Cárcer, D.A., Martín, M., Mackova, M., Macek, T., Karlson, U., and Rivilla, R. (2007). The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. The ISME Journal *1*, 215–223.

Dettenmaier, E. (2008). Measuring and Modeling of Plant Root Uptake of Organic Chemicals (ProQuest).

Dudášová, H., Lukáčová, L., Murínová, S., and Dercová, K. (2012). Effects of plant terpenes on biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). International Biodeterioration & Biodegradation *69*, 23–27.

Dzantor, E.K., and Woolston, J.E. (2001). Enhancing dissipation of Aroclor 1248 (PCB) using substrate amendment in rhizosphere soil. Journal of Environmental Science and Health, Part A *36*, 1861–1871.

Dzantor, E.K., Chekol, T., and Vough, L.R. (2000). Feasibility of using forage grasses and legumes for phytoremediation of organic pollutants. Journal of Environmental Science and Health, Part A *35*, 1645–1661.

Efroymson, R.A., Will, M.E., Suter, G.W., and Wooten, A.C. (1997). Toxicological benchmarks for screening potential contaminants of concern for effects on terrestrial plants: 1997 revision (Oak Ridge National Lab., TN (United States). Funding organisation: USDOE, Washington, DC (United States).

EPA (1997). Technology Alternatives for the Remediation of Soils Contaminated with As, Cd, Cr, Hg, and Pb (US EPA).

Federici, E., Giubilei, M., Santi, G., Zanaroli, G., Negroni, A., Fava, F., Petruccioli, M., and D'Annibale, A. (2012). Bioaugmentation of a historically contaminated soil by polychlorinated biphenyls with Lentinus tigrinus. Microb Cell Factories *11*, 1–35.

Ficko, S.A., Rutter, A., and Zeeb, B.A. (2010). Potential for phytoextraction of PCBs from contaminated soils using weeds. Science of The Total Environment *408*, 3469–3476.

Ficko, S.A., Rutter, A., and Zeeb, B.A. (2011a). Effect of pumpkin root exudates on ex situ polychlorinated biphenyl (PCB) phytoextraction by pumpkin and weed species. Environmental Science and Pollution Research *18*, 1536–1543.

Ficko, S.A., Rutter, A., and Zeeb, B.A. (2011b). Phytoextraction and Uptake Patterns of Weathered Polychlorinated Biphenyl–Contaminated Soils Using Three Perennial Weed Species. Journal of Environment Quality *40*, 1870.

Field, J.A., and Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. Environmental Pollution *155*, 1–12.

Fletcher, J., Groeger, A., McCrady, J., and Mc Farlane, J. (1987). Polychlorobiphenyl (PCB) metabolism by plant cells. Biotechnology Letters *9*, 817–820.

Franchi, E., Rolli, E., Agazzi, G., Borin, S., Pedron, F., Rosellini, I., Barbafieri, M., Petruzzelli, G. (2015). Phytoremediation of a multi contaminated soil: mercury and arsenic phytoextraction assisted by mobilizing agent and plant growth promoting bacteria. Submitted to Journal of Soil and Sediment

Gerhardt, K.E., Huang, X.-D., Glick, B.R., and Greenberg, B.M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. Plant Science *176*, 20–30.

Gilbert, E.S., and Crowley, D.E. (1997). Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by Arthrobacter sp. strain B1B. Applied and Environmental Microbiology *63*, 1933–1938.

Gomes, H.I., Dias-Ferreira, C., and Ribeiro, A.B. (2013). Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. Science of The Total Environment *445-446*, 237–260.

Gutiérrez-Ginés, M.J., Hernández, A.J., Pérez-Leblic, M.I., Pastor, J., and Vangronsveld, J. (2014). Phytoremediation of soils co-contaminated by organic compounds and heavy metals: Bioassays with Lupinus luteus L. and associated endophytic bacteria. Journal of Environmental Management *143*, 197–207.

Habe, H., K. Ide, M. Yotsumoto, H. Tsuji, H. Hirano, J. Widada, T. Yoshida, H. Nojiri, and T. Omori. "Preliminary Examinations for Applying a Carbazole-Degrader, Pseudomonas Sp. Strain CA10, to Dioxin-Contaminated Soil Remediation." Applied Microbiology and Biotechnology 56, no. 5–6 (September 1, 2001): 788–95. doi:10.1007/s002530100707.

Hanano, A., Almousally, I., and Shaban, M. (2014). Phytotoxicity effects and biological responses of Arabidopsis thaliana to 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure. Chemosphere 104, 76–84.

Haraguchi, K. (2004). COMPARATIVE METABOLISM OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND TISSUE DISTRIBUTION OF PERSISTENT METABOLITES IN RATS, HAMSTERS, AND GUINEA PIGS. Drug Metabolism and Disposition *33*, 373–380.

Henry, J.R. (2000). An Overview of the Phytoremediation of Lead and Mercury (National Network of Environmental Management Studies (NNEMS) Fellow).

Hong, C.-Y., Gwak, K.-S., Lee, S.-Y., Kim, S.-H., Lee, S.-M., Kwon, M., and Choi, I.-G. (2012). Biodegradation of PCB congeners by white rot fungus, Ceriporia sp. ZLY-2010, and analysis of metabolites. Journal of Environmental Science and Health, Part A *47*, 1878–1888.

Hovander, T. Malmberg, M. Athanasia, L. (2002). Identification of Hydroxylated PCB Metabolites and Other Phenolic Halogenated Pollutants in Human Blood Plasma. Archives of Environmental Contamination and Toxicology *42*, 105–117.

Ionescu, M., Beranova, K., Dudkova, V., Kochankova, L., Demnerova, K., Macek, T., and Mackova, M. (2009). Isolation and characterization of different plant associated bacteria and their potential to degrade polychlorinated biphenyls. International Biodeterioration & Biodegradation *63*, 667–672.

ITRC (2012). Incremental Sampling Methodology. (Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Incremental Sampling Methodology Team.).

Javorská, H., Tlustoš, P., and Kaliszová, R. (2009). Degradation of Polychlorinated Biphenyls in the Rhizosphere of Rape, Brassica napus L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology *82*, 727–731.

Jha, P., Panwar, J., and Jha, P.N. (2015). Secondary plant metabolites and root exudates: guiding tools for polychlorinated biphenyl biodegradation. International Journal of Environmental Science and Technology *12*, 789–802.

Kim, E.J., Yoo, J.-C., and Baek, K. (2014). Arsenic speciation and bioaccessibility in arsenic-contaminated soils: Sequential extraction and mineralogical investigation. Environmental Pollution *186*, 29–35.

Kučerová, P., Macková, M., Chromá, L., Burkhard, J., Tríska, J., Demnerová, K., and Macek, T. (2000). Metabolism of polychlorinated biphenyls by Solanum nigrum hairy root clone SNC-9O and analysis of transformation products. Plant and Soil *225*, 109–115.

Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. Mol. Plant Microbe Interact. *17*, 6–15.

Kurzawova, V., and Novakova, M. (2012). Transgenic plants in rhizoremediation of PCB-contaminated soil.

Kurzawova, V., Stursa, P., Uhlik, O., Norkova, K., Strohalm, M., Lipov, J., Kochankova, L., and Mackova, M. (2012). Plant–microorganism interactions in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil. New Biotechnology *30*, 15–22.

Lee, J.H. (2013). An overview of phytoremediation as a potentially promising technology for environmental pollution control. Biotechnology and Bioprocess Engineering *18*, 431–439.

Leigh, M.B., Fletcher, J.S., Fu, X., and Schmitz, F.J. (2002). Root Turnover: An Important Source of Microbial Substrates in Rhizosphere Remediation of Recalcitrant Contaminants. Environmental Science & Technology *36*, 1579–1583.

Leigh, M.B., Pellizari, V.H., Uhlík, O., Sutka, R., Rodrigues, J., Ostrom, N.E., Zhou, J., and Tiedje, J.M. (2007). Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). The ISME Journal *1*, 134–148.

Leigh, M.B., Prouzova, P., Mackova, M., Macek, T., Nagle, D.P., and Fletcher, J.S. (2006). Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Bacteria Associated with Trees in a PCB-Contaminated Site. Applied and Environmental Microbiology *72*, 2331–2342.

~~Leigh, M.B., Prouzova, P., Mackova, M., Macek, T., Nagle, D.P., and Fletcher, J.S. (2006). Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Bacteria Associated with Trees in a PCB-Contaminated Site. Applied and Environmental Microbiology *72*, 2331–2342.~~

Lessl, J.T., Luo, J., and Ma, L.Q. (2014). Pteris vittata continuously removed arsenic from non-labile fraction in three contaminated-soils during 3.5 years of phytoextraction. Journal of Hazardous Materials *279*, 485–492.

Li, B., Shi, J.B., Wang, X., Meng, M., Huang, L., Qi, X.L., He, B., and Ye, Z.H. (2013). Variations and constancy of mercury and methylmercury accumulation in rice grown at contaminated paddy field sites in three Provinces of China. Environmental Pollution *181*, 91–97.

Li, H., Liu, L., Lin, C., and Wang, S. (2011). Plant uptake and in-soil degradation of PCB-5 under varying cropping conditions. Chemosphere *84*, 943–949.

Li, Y., Liang, F., Zhu, Y., and Wang, F. (2013). Phytoremediation of a PCB-contaminated soil by alfalfa and tall fescue single and mixed plants cultivation. Journal of Soils and Sediments *13*, 925–931.

Liang, Y., Meggo, R., Hu, D., Schnoor, J.L., and Mattes, T.E. (2014). Enhanced polychlorinated biphenyl removal in a switchgrass rhizosphere by bioaugmentation with Burkholderia xenovorans LB400. Ecological Engineering *71*, 215–222.

Liu, Q., Chen, Y., and Sun, B. (2015). Effects of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins on Soil Nutrition, Soil CO2 Emission, and Mung Bean Seedling Growth. Water Air Soil Pollut 226, 1–11.

Low, J.E., Whitfield Åslund, M.L., Rutter, A., and Zeeb, B.A. (2010). Effect of Plant Age on PCB Accumulation by ssp. Journal of Environment Quality *39*, 245.

Lu, Y.-F., Lu, M., Peng, F., Wan, Y., and Liao, M.-H. (2014). Remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil by using a combination of ryegrass, arbuscular mycorrhizal fungi and earthworms. Chemosphere *106*, 44–50.

Macek, T., Mackova, M., and Káš, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. Biotechnology Advances *18*, 23–34.

Mackova, M., Macek, T., Ocenaskova, J., Burkhard, J., Demnerova, K., and Pazlarova, J. (1997). Biodegradation of polychlorinated biphenyls by plant cells. International Biodeterioration & Biodegradation *39*, 317–325.

Mackova, M., Prouzova, P., Stursa, P., Ryslava, E., Uhlik, O., Beranova, K., Rezek, J., Kurzawova, V., Demnerova, K., and Macek, T. (2009). Phyto/rhizoremediation studies using long-term PCB-contaminated soil. Environmental Science and Pollution Research *16*, 817–829.

Mackova, M., Uhlik, O., Lovecka, P., Viktorova, J., Novakova, M., Demnerova, K., Sylvestre, M., and Macek, T. (2010). Bacterial Degradation of Polychlorinated Biphenyls. In Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective, L.L. Barton, M. Mandl, and A. Loy, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 347–366.

Mandal, A., Purakayastha, T.J., and Patra, A.K. (2014). Phytoextraction of arsenic contaminated soil by Chinese brake fern (Pteris vittata): Effect on soil microbiological activities. Biology and Fertility of Soils *50*, 1247–1252.

McGuinness, M., and Dowling, D. (2009). Plant-Associated Bacterial Degradation of Toxic Organic Compounds in Soil. International Journal of Environmental Research and Public Health *6*, 2226–2247.

Meggo, R.E., and Schnoor, J.L. (2013). Rhizospere redox cycling and implications for rhizosphere biotransformation of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners. Ecological Engineering *57*, 285–292.

Meggo, R.E., Schnoor, J.L., and Hu, D. (2013). Dechlorination of PCBs in the rhizosphere of switchgrass and poplar. Environmental Pollution *178*, 312–321.

Mleczek, M., Rutkowski, P., Rissmann, I., Kaczmarek, Z., Golinski, P., Szentner, K., Strażyńska, K., and Stachowiak, A. (2010). Biomass productivity and phytoremediation potential of Salix alba and Salix viminalis. Biomass and Bioenergy *34*, 1410–1418.

Murínová, S., Dercová, K., and Dudášová, H. (2014). Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by four bacterial isolates obtained from the PCB-contaminated soil and PCB-contaminated sediment. International Biodeterioration & Biodegradation *91*, 52–59.

NATO Advanced Research Workshop on Application of Phytotechnologies for Cleanup of Industrial, Agricultural and Wastewater Contamination to Enhance Environmental and Food Security (2010).

Application of phytotechnologies for cleanup of industrial, agricultural and wastewater contamination (Dordrecht ; London: Springer published in ccoperation with NATO Public Diplomacy Division).
Ohtsubo, Y., Kudo, T., Tsuda, M., and Nagata, Y. (2004). Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. Applied Microbiology and Biotechnology *65*.
Orita, N. (2012). Root uptake of organic contaminants into plants: Species differences.
Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A.A., and Massacci, A. (2014). Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research perspectives. Journal of Hazardous Materials *278*, 189–202.
Petrić, I., Bru, D., Udiković-Kolić, N., Hršak, D., Philippot, L., and Martin-Laurent, F. (2011). Evidence for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term PCB-contaminated soil under bioremediation. Journal of Hazardous Materials *195*, 254–260.
Picer, M., Tarnik, T., Kovac, T., and Hršak, D. (2004). Preparing an investigation field with PCB contaminated soil for phytoremediation research. Fresenius Environmental Bulletin *13*, 1487–1492.
Pinsker, N. (2011). Phytoremediation of PCB Contaminated Soil: Effectiveness and Regulatory Policy.
Qin, H., Brookes, P.C., and Xu, J. (2014b). Cucurbita spp. and Cucumis sativus enhance the dissipation of polychlorinated biphenyl congeners by stimulating soil microbial community development. Environmental Pollution *184*, 306–312.
Qin, H., Brookes, P.C., Xu, J., and Feng, Y. (2014a). Bacterial degradation of Aroclor 1242 in the mycorrhizosphere soils of zucchini (Cucurbita pepo L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. Environmental Science and Pollution Research *21*, 12790–12799.
Qureshi, A., MacLeod, M., Scheringer, M., and Hungerbühler, K. (2009). Mercury cycling and species mass balances in four North American lakes. Environmental Pollution *157*, 452–462.
Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., and Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. Biotechnology Advances *30*, 1562–1574.
Rezek, J., Macek, T., Mackova, M., and Triska, J. (2007). Plant metabolites of polychlorinated biphenyls in hairy root culture of black nightshade Solanum nigrum SNC-9O. Chemosphere *69*, 1221–1227.
Rezek, J., Macek, T., Mackova, M., Triska, J., and Ruzickova, K. (2008). Hydroxy-PCBs, Methoxy-PCBs and Hydroxy-Methoxy-PCBs: Metabolites of Polychlorinated Biphenyls Formed In Vitro by Tobacco Cells. Environmental Science & Technology *42*, 5746–5751.
Russell, K. (2005). The use and effectiveness of Phytoremediation to treat persistent organic pollutants (Environmental Careers Organization).
Ryslavá, E., and Macek, T. (2005). Two approaches to biological decontamination of ground-water and soil polluted by aromatics—characterization of microbial populations. International Microbiology *8*, 205–211.
Saiki, Y., H. Habe, T. Yuuki, M. Ikeda, T. Yoshida, H. Nojiri, and T. Omori. “Rhizoremediation of Dioxin-like Compounds by a Recombinant Rhizobium Tropici Strain Expressing Carbazole 1,9a-Dioxygenase Constitutively.” Bioscience Biotechnology and Biochemistry 67, no. 5 (May 2003): 1144–48.
Secher, C., Lollier, M., Jézéquel, K., Cornu, J.Y., Amalric, L., and Lebeau, T. (2013). Decontamination of a polychlorinated biphenyls-contaminated soil by phytoremediation-assisted bioaugmentation. Biodegradation *24*, 549–562.
Seeger, M., Hernández, M., Méndez, V., Ponce, B., Córdova, M., and González, M. (2010). Bacterial degradation and bioremediation of chlorinated herbicides and biphenyls. Journal of Soil Science and Plant Nutrition *10*, 320–332.
Shehu, J., Imeri, A., Kupe, L., Dodona, E., Shehu, A., and Mullaj, A. (2014). Hyperaccumulators of mercury in the industrial area of a PVC factory in Vlora (Albania). Archives of Biological Sciences *66*, 1457–1464.
Singer, A.C., Smith, D., Jury, W.A., Hathuc, K., and Crowley, D.E. (2003). Impact of the plant rhizosphere and augmentation on remediation of polychlorinated biphenyl contaminated soil. Environmental Toxicology and Chemistry *22*, 1998–2004.

Slater, H., Gouin, T., and Leigh, M.B. (2011). Assessing the potential for rhizoremediation of PCB contaminated soils in northern regions using native tree species. Chemosphere *84*, 199–206.
Smith, K.E., Schwab, A.P., and Banks, M.K. (2007). Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Contaminated Sediment. Journal of Environment Quality *36*, 239.
Srivastava, S., and Singh, N. (2014). Mitigation approach of arsenic toxicity in chickpea grown in arsenic amended soil with arsenic tolerant plant growth promoting Acinetobacter sp. Ecological Engineering *70*, 146–153.
Su, Y., Shiyab, S., and Monts, D. (2007). Phytoextraction and accumulation of mercury in selected plant species grown in soil contaminated with different mercury compounds. WM 2007.
Teng, Y., Luo, Y., Sun, X., Tu, C., Xu, L., Liu, W., Li, Z., and Christie, P. (2010). Influence of Arbuscular Mycorrhiza and Rhizobium on Phytoremediation by Alfalfa of an Agricultural Soil Contaminated with Weathered PCBs: A Field Study. International Journal of Phytoremediation *12*, 516–533.
Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., Li, Z., and Christie, P. (2011). Influence of Rhizobium meliloti on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. Journal of Hazardous Materials *186*, 1271–1276.
Titah, H.S., Abdullah, S.R.S., Mushrifah, I., Anuar, N., Basri, H., and Mukhlisin, M. (2013). Effect of applying rhizobacteria and fertilizer on the growth of Ludwigia octovalvis for arsenic uptake and accumulation in phytoremediation. Ecological Engineering *58*, 303–313.
Toussaint, J.-P., Pham, T.T.M., Barriault, D., and Sylvestre, M. (2012). Plant exudates promote PCB degradation by a rhodococcal rhizobacteria. Applied Microbiology and Biotechnology *95*, 1589–1603.
Tu, C., Teng, Y., Luo, Y., Sun, X., Deng, S., Li, Z., Liu, W., and Xu, Z. (2011). PCB removal, soil enzyme activities, and microbial community structures during the phytoremediation by alfalfa in field soils. Journal of Soils and Sediments *11*, 649–656.
Uhlik, O., Musilova, L., Ridl, J., Hroudova, M., Vlcek, C., Koubek, J., Holeckova, M., Mackova, M., and Macek, T. (2013). Plant secondary metabolite-induced shifts in bacterial community structure and degradative ability in contaminated soil. Applied Microbiology and Biotechnology *97*, 9245–9256.
USEPA (2001). Brownfields Technology Primer: Selecting and Using Phytoremediation for Site Cleanup (US EPA Office of Solid Waste and Emergency Response).
Van Aken, B., Correa, P.A., and Schnoor, J.L. (2010). Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises †. Environmental Science & Technology *44*, 2767–2776.
Villacieros, M., Whelan, C., Mackova, M., Molgaard, J., Sanchez-Contreras, M., Lloret, J., Aguirre de Carcer, D., Oruezabal, R.I., Bolanos, L., Macek, T., et al. (2005). Polychlorinated Biphenyl Rhizoremediation by Pseudomonas fluorescens F113 Derivatives, Using a Sinorhizobium meliloti nod System To Drive bph Gene Expression. Applied and Environmental Microbiology *71*, 2687–2694.
Wang, J., Feng, X., Anderson, C.W.N., Wang, H., and Wang, L. (2014). Thiosulphate-induced mercury accumulation by plants: metal uptake and transformation of mercury fractionation in soil - results from a field study. Plant and Soil *375*, 21–33.
Wang, J., Zhao, F.-J., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., and McGrath, S.P. (2002). Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in Pteris vittata. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. Plant Physiol *130*, 1552–1561.
Wang, Y., and Oyaizu, H. (2009). Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials *168*, 760–764.
Wang, Yanxu, and Hiroshi Oyaizu. “Enhanced Remediation of Dioxins-Spiked Soil by a Plant-Microbe System Using a Dibenzofuran-Degrading Comamonas Sp and Trifolium Repens L.” Chemosphere 85, no. 7 (November 2011): 1109–14. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.028.
Whitfield Aslund, M., Zeeb, B., Rutter, A., and Reimer, K. (2007). In situ phytoextraction of polychlorinated biphenyl — (PCB)contaminated soil. Science of The Total Environment *374*, 1–12.

Whitfield Åslund, M.L., Rutter, A., Reimer, K.J., and Zeeb, B.A. (2008). The effects of repeated planting, planting density, and specific transfer pathways on PCB uptake by Cucurbita pepo grown in field conditions. Science of The Total Environment *405*, 14–25.

Witters, N., Mendelsohn, R., Van Passel, S., Van Slycken, S., Weyens, N., Schreurs, E., Meers, E., Tack, F., Vanheusden, B., and Vangronsveld, J. (2012). Phytoremediation, a sustainable remediation technology? II: Economic assessment of CO2 abatement through the use of phytoremediation crops for renewable energy production. Biomass and Bioenergy *39*, 470–477.

Wyrwicka, A., Steffani, S., and Urbaniak, M. (2014). The effect of PCB-contaminated sewage sludge and sediment on metabolism of cucumber plants (Cucumis sativus L.). Ecohydrology & Hydrobiology *14*, 75–82.

Xu, J., Li, H., Liang, S., Luo, J., and Ma, L.Q. (2014). Arsenic enhanced plant growth and altered rhizosphere characteristics of hyperaccumulator Pteris vittata. Environmental Pollution *194*, 105–111.

Xu, L., Teng, Y., Li, Z.-G., Norton, J.M., and Luo, Y.-M. (2010). Enhanced removal of polychlorinated biphenyls from alfalfa rhizosphere soil in a field study: The impact of a rhizobial inoculum. Science of The Total Environment *408*, 1007–1013.

Yang, M., Xiao, X., Miao, X., Guo, Z., and Wang, F. (2012). Effect of amendments on growth and metal uptake of giant reed (Arundo donax L.) grown on soil contaminated by arsenic, cadmium and lead. Transactions of Nonferrous Metals Society of China *22*, 1462–1469.

Zhai, G., Hu, D., Lehmler, H.-J., and Schnoor, J.L. (2011). Enantioselective Biotransformation of Chiral PCBs in Whole Poplar Plants. Environmental

Protocollo per preparazione ed omogeneizzazione del suolo per esperimenti di *rhizoremediation* in vaso

Prelievo del suolo

Il terreno deve essere prelevato in una o più zone caratterizzate dalla concentrazione media selezionata per le 4 categorie di sostanze (PCB, PCDD/F, arsenico e mercurio). L'analisi geostatistica dei dati di concentrazione di arsenico, mercurio, PCB e PCDD/F (I-TEF) contenuti nello strato 0-40 ha permesso di ottenere delle aree (in blu in Figure 1 e 2).
Tali aree soddisfano contemporaneamente i seguenti vincoli:

- Concentrazioni di As comprese tra 50 e 80 mg/kg
- Concentrazioni di Hg comprese tra 3.5 e 5.4 mg/kg
- Concentrazioni di PCDD/F I-TEF comprese tra 0.05 e 0.08 µg/kg
- Concentrazioni di PCBs comprese tra 1000 e 2000 µg/kg

I limiti corrispondono per ogni contaminante ai quantili 0.7 e 0.9 dedotti dagli istogrammi cumulati delle concentrazioni di tutti i punti campionati nella fase 3. Il limite inferiore dell'As sarebbe dovuto essere di 60 mg/kg; tuttavia, per ottenere un numero sufficiente di punti è stato abbassato a 50 mg/kg.

Tali range individuano un suolo che comprende circa il 20% delle intere aree, mentre il 70 % di queste presenta concentrazioni più basse e il restante 10% concentrazioni più alte.

Occorre precisare che non è detto che i punti riportati in mappa si collochino in corrispondenza delle concentrazioni medie degli intervalli poichè devono soddisfare contemporaneamente ai 4 vincoli.

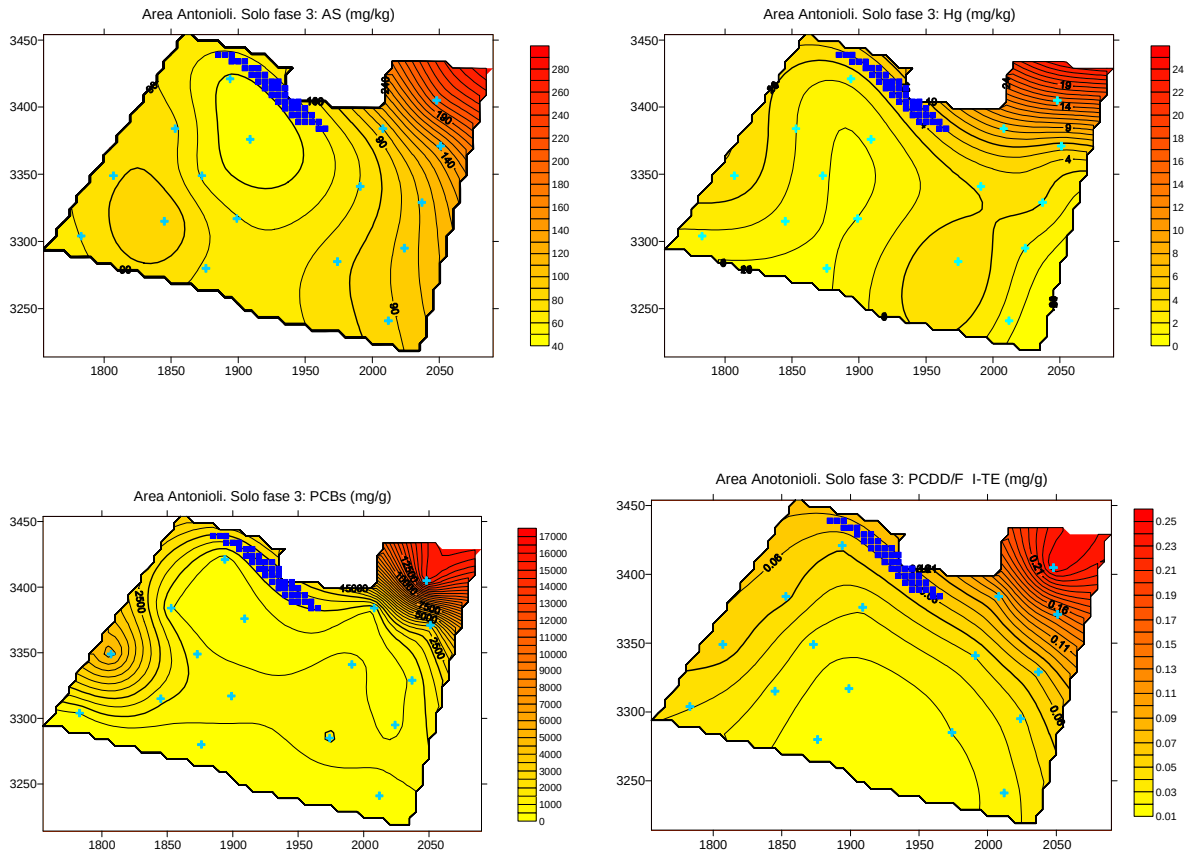


Figura 1 - Distribuzione spaziale delle concentrazioni di As, Hg, PCBs e PCDD/F (I-TEF) e aree selezionabili per prelievo di suolo nell'area Antonioli

ALLEGATO N 2- **Protocollo preparazione suolo per esperimenti**

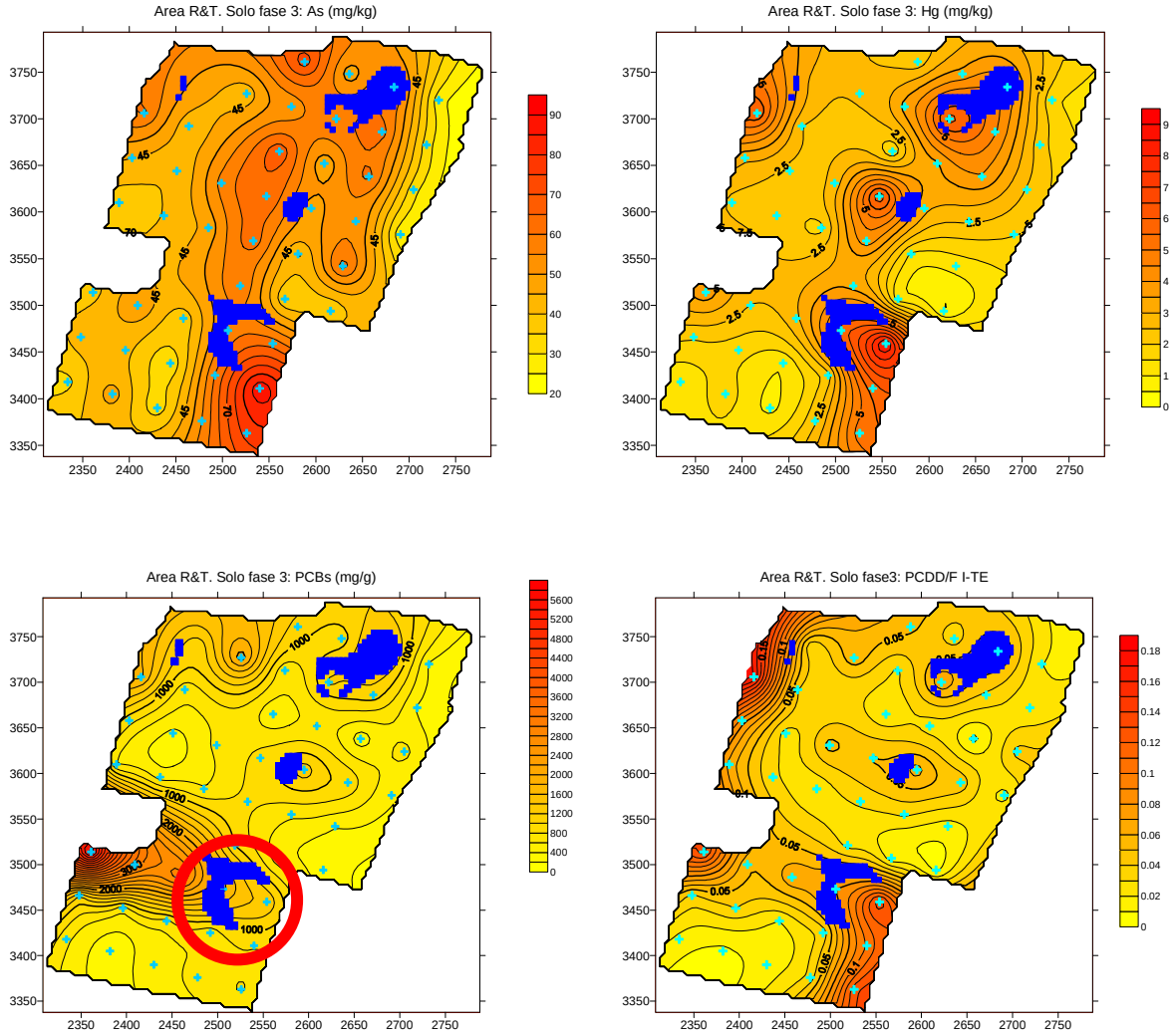


Figura 2 - Distribuzione spaziale delle concentrazioni di As, Hg, PCBs e PCDD/F (I-TEF) e aree selezionabili per prelievo di suolo nelle aree Ronchi e Tomasoni. L'area cerchiata in rosso è quella suggerita per il prelievo del suolo.

Fra le aree selezionabili nelle mappe di Figura 1 e 2 (in blu), viene suggerita l'area a sud-est di Figura 2, in quanto in tale zona sono state effettuate le misure in profondità di fase 2 e quindi si hanno informazioni sulla presumibile distribuzione in profondità dei contaminanti in quell'area. Tale necessità deriva dal fatto che nella successiva erpicatura la profondità esplorabile sarà compresa fra 0 e 20 cm e che quindi il dato di concentrazione media ricavato dalle mappe ottenute dai dati di fase 3 dovrà essere in qualche modo corretto con i dati di profondità. Il punto più vicino della fase 3 è il F3T23 mentre il punto più vicino della fase 2 è il T1. Vagliando i risultati del punto T1 nella profondità 0-20 permetterebbero di ritenere (sempre che la distribuzione con la profondità sia costante) che i range enunciati si conservino per As e PCDD/F I-TEF, ma che si collochino più bassi per Hg e PCBs::

- Concentrazioni di As comprese tra 50 e 80 mg/kg
- Concentrazioni di Hg comprese tra 10 e 11 mg/kg
- Concentrazioni di PCDD/F I-TEF comprese tra 0.09 e 0.11 µg/kg
- Concentrazioni di PCBs comprese tra 2500 e 3500 µg/kg

Preparazione suolo (rottura aggregati)

All'interno dell'area selezionata il suolo deve essere preparato e ridotto ad aggregati quanto più piccoli possibili (di circa 1-3 mm) con erpice rotante, dopo scotico preliminare come se si preparasse un letto di semina. Deve essere posta particolare attenzione affinchè il terreno sia in tempera per potere spezzettare adeguatamente gli aggregati. L'azione verrà concentrata nei primi 20 cm. Tale operazione

permetterà di ottenere un suolo caratterizzato presumibilmente da concentrazioni medie dello stesso ordine di grandezza delle concentrazioni prodotte dalle analisi di Fase 3 (vedi sopra).

Supponendo di avere raccolto una quantità di terreno pari a 1,5 m^3 (valore esatto da determinare ma probabilmente con un massimo di 1.7 - 1.8 m^3) si potrà ottenere la successiva omogeneizzazione dopo adeguata miscelazione e quartatura, da impiegare anche nella preparazione dei vasi.

Strumento per miscelazione

Per la miscelazione viene utilizzata una benna miscelatrice (supponendo abbia una capacità di 0.5 m^3). Si consiglia di effettuare delle prove di miscelazione (con lo stesso suolo del sito BS CAFFARO) prima della data effettiva al fine di verificare la bontà della miscelazione e l'assenza di segregazione di particelle di dimensioni diverse. Tale prova servirà anche a verificare il corretto funzionamento dello strumento con il suolo in esame.

Omogeneizzazione

Il suolo prelevato viene così diviso in 4 frazioni (mucchi) da circa 0.375 m^3, appoggiati su un telo di HDPE. Tale operazione verrà effettuata in prossimità del punto di prelievo, in condizioni metereorologiche caratterizzate dall'assenza di precipitazioni e vento.
Le singole frazioni (A, B, C, D) vengono inizialmente miscelate una alla volta con la benna e riposte nei singoli mucchi (Figura 1).

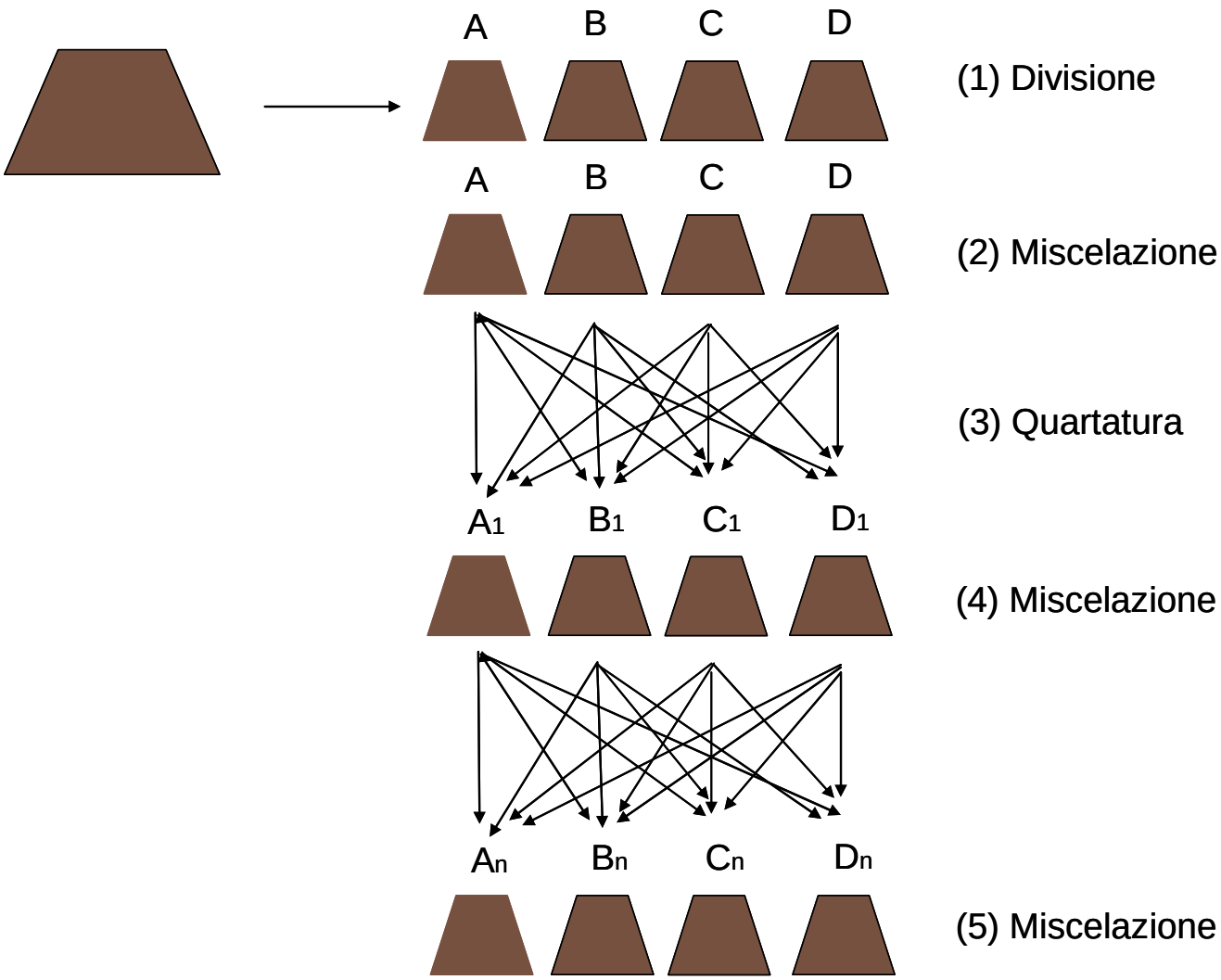


Figura 1 - Schema di divisione campione iniziale di suolo, quartatura e miscelazione

ALLEGATO N 2- **Protocollo preparazione suolo per esperimenti**

La durata della miscelazione deve essere valutata a seconda dell'efficacia della stessa, e non deve essere inferiore a 15 minuti per volta (assicurandosi che l'intera operazione di miscelazione e quartatura sia finita in una giornata di lavoro).

Viene prelevato quindi un quarto di ogni frazione (circa 0.090 m^3) e inserito nella benna per la prima quartatura e miscelazione ((3) e (4) in Figura 1) , ricreando poi nuovi 4 mucchi prodotti dal rimescolamento dei 4 mucchi precedenti.

Si consiglia di ripetere l'operazione (3) e (4) almeno quattro volte.

Alla fine della miscelazione si avranno sempre 4 mucchi.

I cumuli saranno formati in campo in prossimità dell'area di prelievo mentre l'operazione di riempimento dei vasi verrà effettuata in prossimità della serra. Si rende quindi necessario trasferire i 4 cumuli dall'area di prelievo del terreno alla serra. Per fare questo i mucchi andranno messi in big bags (sigillate con un telo di HDPE per evitare che entri umidità e che volatilizzino frazioni).

Prima però della fase di ripartizione della terra in vasi, occorre prendere un numero congruo di repliche (almeno 5) per verificare l'omogeneità delle concentrazioni.

A tal scopo, dopo la miscelazione con la benna secondo il protocollo visto sopra, un' ulteriore frazionamento dovrà essere effettuato per preparare un campione rappresentativo delle frazioni di suolo. Tale metodologia di campionamento incrementale (Incremental sampling methodology-ISM) (ITRC 2012), è mirata a ridurre la variabilità dei dati e ad aumentare la rappresentatività dei campioni. Tale metodologia si basa sulla teoria di Gy, ovvero sulla più consolidata e matematicamente sviluppata teoria per il campionamento di materiale particolato, tradotta in inglese da Pitard nel 1993 e da questi estesa alle applicazioni ambientali.
Il campione (eventualmente essiccato e/o setacciato, se necessario, per ottenere particelle aventi dimensioni <2 mm) andrebbe riversato su una superficie pulita in modo che il trasferimento avvenga secondo strati successivi, ovvero riversando partendo da un estremo e andando verso l'altro, operazione da esguire parecchie volte (**stratificazione campione**). . I sottocampioni vengono preparati raccogliendo a caso 30 o più incrementi di suolo, ugualmente spaziati, e combinandoli fisicamente in un unico campione avente la massa totale richiesta.

In considerazione delle difficoltà di ottenere un campione rappresentativo in condizioni di campo la prova può essere semplificata per valutare la capacità di miscelazione della benna, ovvero su uno solo dei 4 mucchi. Il mucchio viene riversato più volte con la procedura di **stratificazione campione** illustrata sopra.

Viene stesa su una superficie piana una quantità di suolo, prelevata dal mucchio che possa corrispondere a circa 100 litri. Tale quantità viene prelevata da una frazione del mucchio, e viene anch'essa riversata in direzione della lunghezza con la procedura di **stratificazione campione** illustrata sopra (Figura 2). L'altezza della parte spianata deve essere inferiore all'altezza dei bordi della paletta usata (Figura 3, in basso).

Per ottimizzare la creazione di tale strato potrà essere utilizzata una cornice in legno di 50x500 cm .di altezza 4 cm, in modo da potere meglio creare una slabcake di altezza e dimensioni adeguate al successivo campionamento.

Il suolo viene quindi campionato Ii direzione ortogonale con una paletta a base piatta con bordi rialzati ortogonali (parte in basso di Figura 3). In figura viene evidenziato come la paletta a forma semi circolare (in alto) prelevi un campione parziale, mentre quella a fondo rettangolare preleva tutte le particelle presenti (grandi e piccole).

ALLEGATO N 2- **Protocollo preparazione suolo per esperimenti**

Per ogni quantità equivalente al volume di terra per un vaso (circa 15 litri) dovranno essere prelevate almeno 30 frazioni con la paletta (di circa 0.5 L ciascuna) e miscelate accuratamente nell'insalatiera più grande (contenitori in acciaio usati per la fase 1).
Le frazioni devono essere prese casualmente in tutta la lunghezza del cumulo spianato, facendo attenzione a prelevare anche la parte a contatto con la superficie inferiore) (frazione più fine).

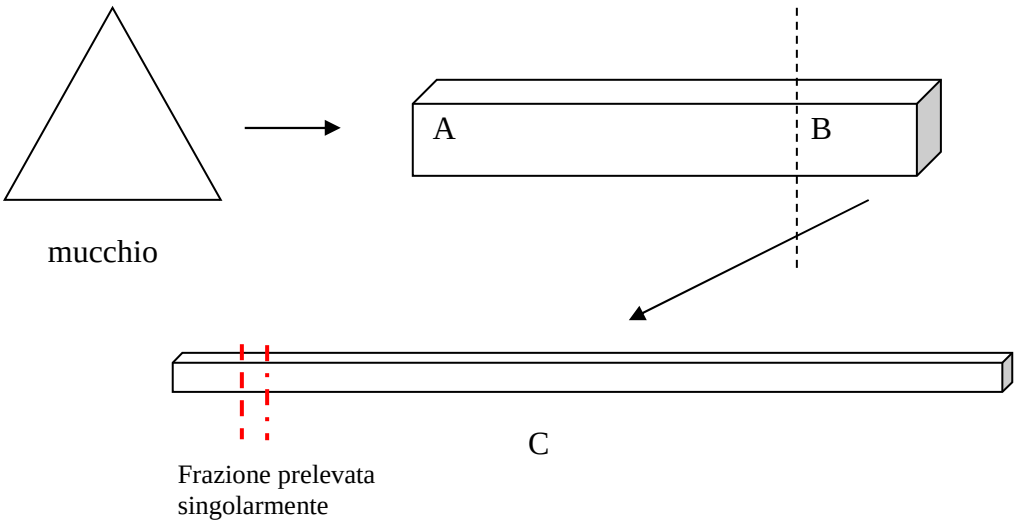


Figura 2 – Transizione da mucchio a frazione spianata da cui viene preso un subcampione (B) e spianato per il prelievo (C)

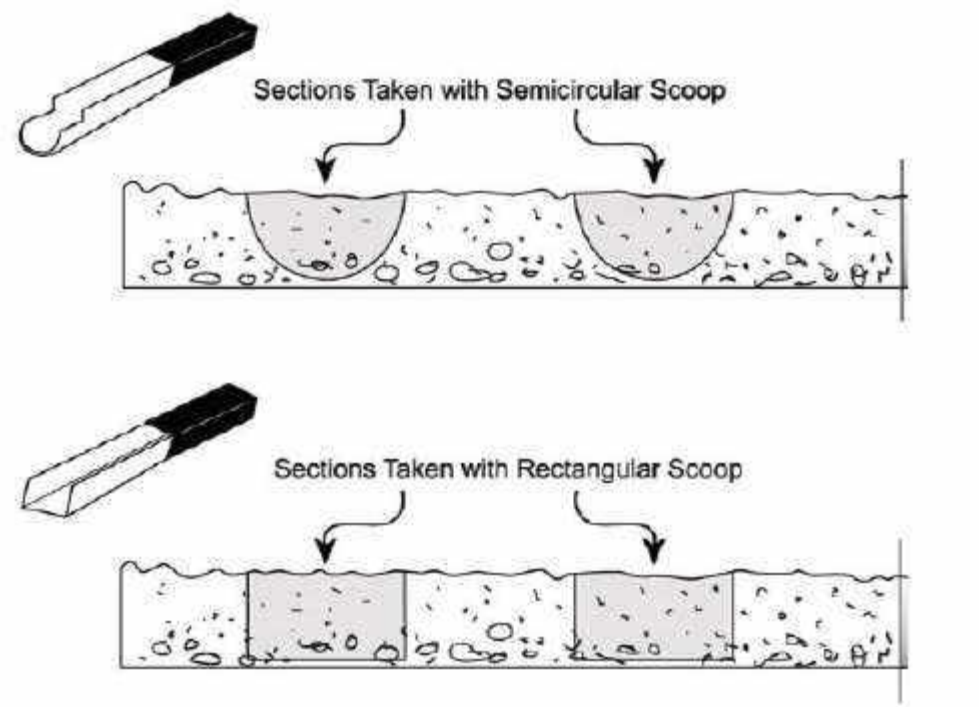


Figura 3 . Efficienza di prelievo di paletta semi circolare (in alto) e a fondo rettangolare (in basso)

ALLEGATO N 2- **Protocollo preparazione suolo per esperimenti**

Una volta ottenuta una frazione pari a 15 litri circa, tale frazione verrà imbustata in una busta di polietilene e conservata fino alla fase di scomposizione del volume in aliquote più piccole per la preparazione del vasetto da campionamento (pari a circa 1 litro). Tale operazione andrà effettuata su un tavolo o una superficie simile piana, con le modalità viste prima (la procedura di **stratificazione campione** illustrata sopra e il prelievo di almeno 30 frazioni prese con una paletta a fondo piatto, ovviamente di dimensioni molto piccole, con ogni prelievo di circa 30 ml, circa 50-60g). Prima di inserirle nel vasetto le frazioni andarnno miscelate accuratamente nell'insalatiera (contenitori in acciaio usati per la fase 1) metallica più piccola. Non occorre lavare l'insalatiera fra un campione e l'altro.

Questa operazione va ripetuta per ogni campione. Il laboratorio dovrà analizzare il vasetto assicurando la miscelazione ed il prelievo del campione necessario per le varie estrazioni con la procedura di **stratificazione campione** e di campionamento incrementale (almeno 30 frazioni con spatola piatta) vista sopra.

Questi 5 vasi andranno analizzati per le seguenti classi di sostanze: **PCB totali (bassa risoluzione), As, Hg e carbonio organico**. La valutazione della media e della deviazione standard (o errore standard) permetteranno di valutare la bontà del lavoro di miscelazione. In letteratura (Picer et al., 2004) la deviazione standard dei PCB dopo una semplice opera di rimescolamento in betoniera appare compresa fra 10 e 30 % a seconda del congenere. Ci auguriamo che tale protocollo porti a sensibili abbassamenti della variabilità fra le repliche.

Se l'omogeneizzazione è soddisfacente si potranno riempire i vasi per gli esperimenti con la metodologia illustrata sopra. In caso contrario occorrerà valutare ulteriormente i criteri di omogeneizzazione del suolo.

Omogenizzazione per costituzione vasi per esperimenti

Per preparare campioni idealmente simili si prevede di utilizzare una piccola JSC (japanese slab cake) secondo le fasi:
(a) Distribuzione su una JSC di aliquote di 10 kg alla volta si suolo setacciato, fino a completare la superficie disponibile (contenuta ad esempio all'interno di una cornice bassa (es 100 kg)
(b) Prelievo con spatola a fondo piatto di n aliquote (corrispondenti ai vasi necessari, immaginiamo 100) (da 1/100 della JSC) che vengono singolarmente versate in n (immaginiamo 100) sacchi di HDPE (che diventeranno il quantitativo per i vasi)
(c) Ripetizione delle operazioni (a -->b) fino ad esaurimento terra

Il suolo dei sacchi dovrà essere rimescolato ben bene all'atto della preparazione dei vasi.

Razionale del metodo proposto
Lo schema che si propone di adottare per confezionare 5 repliche di un campione rappresentativo del materiale di un mucchio contribuisce notevolmente ad aumentare il grado di omogeneizzazione del materiale. Infatti esso costituisce un vero e proprio processo di omogeneizzazione del materiale dal mucchio fino all'unità volumetrica finale, espletando questa azione attraverso i passaggi:

§ Dalla scala del mucchio (375 l) alla scala dei 100 l mediante stesura e ripresa (stratificazione)

§ Dalla scala dei 100 l alla scala alla scala dei 15 l mediante stesura e ripresa (stratificazione + 30 prelievi))

§ Dalla scala dei 15 l alla scala del litro mediante omogeneizzazione nell'insalatiera e stesura e ripresa (stratificazione + 30 prelievi).

ALLEGATO N 2- **Protocollo preparazione suolo per esperimenti**

Dalla scala del litro l alla scala del 5-10 grammi che verranno analizzati dal laboratorio mediante setacciatura ed omogeneizzazione e stesura e ripresa (stratificazione + 30 prelievi).

Bibliografia

Picer, Mladen, Tamara Tarnik, Tanja Kovac, and Dubravka Hršak. “Preparing an Investigation Field with PCB Contaminated Soil for Phytoremediation Research.” *Fresenius Environmental Bulletin* 13 (2004): 1487–92.

ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council). 2012. *Incremental Sampling Methodology*. ISM-1. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Incremental Sampling Methodology Team. www.itrcweb.org.

PROTOCOLLO SPERIMENTAZIONE IN SERRA ERSAF

INDICE

1. Specie selezionate
2. Trattamenti/tesi
3. Controlli
4. Repliche e tempi
5. Tipologia di vasi
6. Recupero acqua
7. Marcatura dei vasi
8. Disposizione dei vasi
9. Lavaggio attrezzi, piani di lavoro e contenitori di vetro per campioni
10. Preparazione suolo da mettere nei vasi
11. Riempimento dei vasi
12. Semina/trapianto
13. Trattamenti particolari
    - 13.1 Ciclo redox
    - 13.2 Aggiunta di compost
    - 13.3 Consociazione e panetto
    - 13.4 Aggiunta micorrize/rizobio
    - 13.5 Aggiunta tiosolfato
14. Fertilizzazione
15. Irrigazione
16. Protezione da parassiti ed erbe infestanti
17. Altre misure
18. Tipo e numerosità di matrici da campionare e analizzare
19. Etichettatura contenitori campioni
20. Riempimento vasetti/sacchetti con suolo omogenato
21. Esecuzione controlli a t0
22. Campionamento
23. Conservazione dei campioni
24. Fotografie
25. Contaminati da ricercare ed altre analisi
26. Catena di custodia
27. Registro della sperimentazione

1. Specie selezionate

Le specie di piante selezionate per la sperimentazione sono elencate di seguito:

- *Phalaris arundinacea*
- *Festuca arundinacea*
- *Cucurbita pepo spp pepo*
- *Medicago sativa*
- *Salix caprea*
- *Athyrium filix-femina*
- *Brassica juncea*

2. Trattamenti/Tesi

Di seguito vengono riportati i vari tipi di trattamenti/tesi considerati per la sperimentazione:

- *Phalaris arundinacea*
  - solo pianta
  - ciclo redox
- *Festuca arundinacea*
  - solo pianta
  - consociazione con *Cucurbita pepo spp pepo*
  - ciclo redox
  - aggiunta compost (DOC producer)
- *Medicago sativa*
  - micorrize e rizobio
- *Salix caprea*
  - consociazione con *Athyrium filix-femina*
- *Brassica juncea*
  - solo pianta
  - aggiunta tiosolfato

3. Controlli

I controlli che andranno allesti sono i seguenti:

- C1: suolo contaminato senza pianta e non fertilizzato
- C2: suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato
- C3: suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con ciclo redox
- C4: suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con tiosolfato
- C5: suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con aggiunta di compost
- C6: suolo non contaminato con pianta e fertilizzato (*Medicago sativa* + *Festuca arundinacea*)
- C7: suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con panetto di terra

I controlli (a parte il C1, suolo non fertilizzato), andranno tutti fertilizzati come le tesi con le piante (a parte al t0). Questo per sottoporre alle stesse condizioni delle piante. I controlli (tutti, a parte al t0), così come le piante andranno anche irrigati allo stessa frazione di capacità di campo (es. 60-70 %), in modo da mantenere condizioni di umidità paragonabili fra le tesi

4. Repliche e tempi

Per ogni trattamento devono essere allestite tre repliche sacrificali per ciascun tempo sperimentale. I tempi da prendere in considerazione sono i seguenti (**Figura 1**):

PRIMO ANNO SPERIMENTAZIONE

- t0: aprile 2015
- t1: luglio 2015
- t2: ottobre 2015

SECONDO ANNO SPERIMENTAZIONE

- t3: luglio 2016
- t4: ottobre 2016

NB: I tempi andranno rivisti visto che il t0 è stato posticipato a maggio 2015.

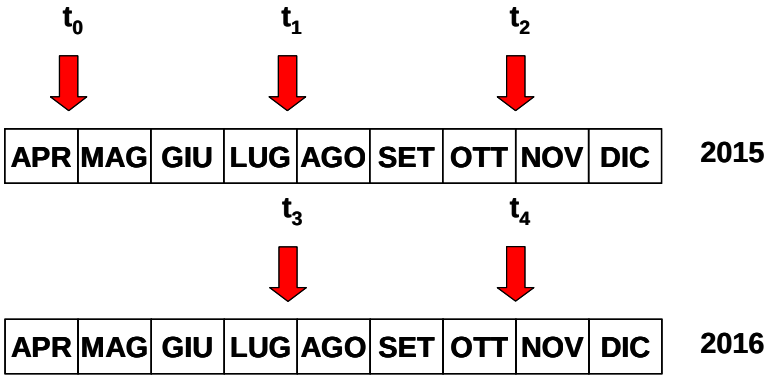


Figura 1 - Schema tempi campionamento sperimentazione in serra

Occorre tener presente che le piante annuali (*Cucurbita pepo spp pepo*) andranno riseminate ad aprile 2016. Le piante annuali andranno lasciate nel vaso alla fine del primo anno di sperimentazione nei vasi del t3 e del t4.

5. Tipologia di vasi

La **Figura 2** mostra la tipologia di vaso che verrà utilizzatà per la sperimentazione. Di seguito vengono elencate le caratteristiche: Diametro: 25 cm; Altezza: 20 cm; Volume: circa 6 l; Materiale: polipropilene.

Sarebbe meglio associare un colore a ciascuna tipo di trattamento (solo pianta, redox, consociazione, micorrize/rizobio, compost, tiosolfato, funghi) o utilizzare due colori diversi per separare i controlli dai trattamenti. Siccome i vasi sono forati, verrà utilizzato del tessuto non tessuto per chiudere i fori. Questo comporta che occorrerà fare attenzione al momento del campionamento a non prelevare il suolo adeso al tessuto non tessuto che rappresenta una condizione diversa dal suolo bulk contenuto nel vaso. Per la tesi ciclo redox è previsto di utilizzare un vaso forato accoppiato ad uno non forato (entrambi dello stesso colore).



Figura 2 - Tipologia di vasi utilizzati per la sperimentazione

6. Recupero acqua

L' acqua che sgronda dai vasi verrà raccolta nell' apposita vaschetta installata su ogni bancale e convogliata in un bidone. Un' aliquota nota di quest' acqua verrà prelevata per l' analisi da parte di UNINS (al fine di ricostruire il bilancio di massa), mentre la restante dovrà (dopo aver misurato il volume) essere filtrata in modo da eliminare i contaminanti.

7. Marcatura vasi

Apposite sigle dovranno essere utilizzate per ciascun vaso tenendo conto di tipologia di trattamento, replica e tempo.

Le sigle pensate per i trattamenti sono le seguenti:

- *Phalaris arundinacea* solo pianta: PhaNORM
- *Phalaris arundinacea* con ciclo redox: PhaRED
- *Festuca arundinacea* solo pianta: FesNORM
- *Festuca arundinacea* con *Cucurbita pepo spp*: Fes+Cuc
- *Festuca arundinacea* con ciclo redox: FesRED
- *Festuca arundinacea* con compost: FesCOM
- *Medicago sativa* con rizobio/micorrize: Med
- *Salix caprea* con *Athyrium filix femina*: Sal+Athy
- *Brassica juncea* solo pianta: BrasNORM
- *Brassica juncea* con tiosolfato: BrasTIO

Le sigle pensate per i controlli sono le seguenti:

- C1: NOplantNOfer
- C2: NOplantSIfer
- C3: NOplantSIferRED
- C4: NOplantSIferTIO
- C5: NOplantSIferCOM
- C6: CleanSIplantSIfer
- C7: NoplantSIferPAN

Le repliche verranno numerate in modo progressivo da 1 a 3, mentre i tempi in modo progressivo da t0 a t4.

Quindi ad esempio il vaso del trattamento *Phalaris arundinacea* solo pianta, replica 1, tempo 1 dovrà essere marcato con la seguente sigla (**Figura 3**):



Figura 3 - Esempio etichetta marcatura vasi

I vasi dovranno essere marcati all' esterno con pennarello indelebile (tipo Uniposca) con le opportune sigle. In più occorerrà inserire in ogni vaso un cartellino con la stessa sigla. Il cartellino dovrà essere di colore diverso a seconda del trattamento e per i controlli. Inoltre sotto a ciascun vaso verrà scritto un numero progressivo. Ogni numero quindi corrisponderà ad una replica di una specifica tesi a uno

specifico tempo. La **Tabella A (Cronoprogramma ERSAF.xls)** allegata mostra le corrispondenze del numero con trattamento/replica/tempo.

8. Disposizione dei vasi

Ci si deve assicurare che i vasi siano ben distanziati (non si facciano ombra) e non ci siano gradienti particolarmente importanti (es. temperatura nel caso in cui le aperture siano sul lato corto). Si potrebbero inoltre girare i vasi di ogni bancale ad esempio ogni settimana. Inoltre:

- i vasi da sottoporre a ciclo redox andranno posizionati sullo stesso bancale: occorrerano 2 bancali in quanto ci saranno 36 vasi in tutto per i quali è previsto ciclo redox (FesRED, PhaRED, C3).

- le repliche di una stessa tesi andranno sullo stesso bancale insieme ai rispettivi controlli como mostrato in **Figura 4** (**Disposizione vasi ERSAF.ppt**).

- i controlli andranno posizionati nelle prime file in modo tale da limitare l'ombra per le piante che ci saranno dietro.

- su ogni bancale ci staranno 18 vasi. Avendo 14 bancali significa che 2 rimarranno liberi, quindi si può pensare di utilizzare più bancali per la zucchina che cresceranno in larghezza.

9. Lavaggio attrezzi, piani di lavoro e contenitori di vetro per campioni

Si rimanda al “Protocollo per prelievo campioni di suolo delle fasi 2 e 3 in terreni agricoli del SIN Brescia Caffaro (Versione, Luglio 2014)”. Si riassumono di seguito le parti principali da prendere in considerazione.

Decontaminazione in campo di strumenti da campionamento

1. Lavaggio con detergente e acqua di rete (per rimuovere particelle, tracce di suolo, grasso, residui in genere, anche da materiale nuovo, come i vasi in vetro).
2. Risciacquo abbondante con acqua di rete per rimuovere le tracce di detergente.
3. Risciacquo con acqua deionizzata per rimuovere tracce di calcare. E’ possibile usare acqua deionizzata/distillata commerciale.
4. Per ottenere una minima “bonifica microbiologica”, gli utensili che verranno a contatto con il campione si devono pulire con della carta (pulita) bagnata con alcool denaturato (senza più toccarli con le mani nude). Inoltre per la pulizia degli strumenti usati (cucchiaio/spatola/pinzetta) tra un campionamento microbiologico e quello successivo sarà necessario predisporre un contenitore con alcool denaturato e accendino per poter sterilizzare mediante fiamma.

10. Preparazione suolo da mettere nei vasi

Si rimanda al "Protocollo per preparazione ed omogeneizzazione del suolo per esperimenti di *rhizoremediation* in vaso (Versione 1.34 (???) Aprile 2015)".

11. Riempimento dei vasi

Si rimanda al "Protocollo per preparazione ed omogeneizzazione del suolo per esperimenti di *rhizoremediation* in vaso". (Versione 1.34 (???) Aprile 2015). Si riassumono di seguito le parti principali da prendere in considerazione.

Omogenizzazione per costituzione vasi per esperimenti

Per preparare campioni idealmente simili si prevede di utilizzare una piccola JSC (japanese slab cake) secondo le fasi:

(a) Distribuzione su una JSC di aliquote di 10 kg alla volta di suolo setacciato, fino a completare la superficie disponibile (contenuta ad esempio all'interno di una cornice bassa (es 100 kg).

(b) Prelievo con spatola a fondo piatto di n aliquote (corrispondenti ai vasi necessari, immaginiamo 100) (da 1/100 della JSC) che vengono singolarmente versate in n (immaginiamo 100) sacchi di HDPE (che diventeranno il quantitativo per i vasi).

(c) Ripetizione delle operazioni (a -->b) fino ad esaurimento terra.

Il suolo dei sacchi dovrà essere rimescolato ben bene all'atto della preparazione dei vasi.

Per la tesi 6, che prevede l' aggiunta di compost al vaso (vedere punto 13.2), il suolo dovrà essere miscelato al compost e in seguito dovrà essere allestita una JSC come descritto sopra. Lo stesso vale per i controlli C5 e C7 che prevedono l'aggiunta di compost e panetti di terra rispettivamente.

12. Semina/trapianto

Tutte le specie, ad eccezione di *Salix caprea* e *Athyrium filix femina* per le quali verrano utilizzate delle plantule, verranno fatte cresce da seme. Di seguito si riportano alcune informazione trovate in letteratura.

- *Phalaris arundinacea:* 30 semi per vaso e poi eventuale diradamento
- *Festuca arundinacea:* 30 semi per vaso e poi eventuale diradamento
- *Cucurbita pepo spp pepo:* 3 semi per vaso e poi eventuale diradamento
- *Medicago sativa:* 30 semi per vaso e poi eventuale diradamento
- *Salix caprea:* 2 plantule poi ridotta a 1 se entrambe attecchiscono
- *Athyrium filix-femina:* 5 plantule poi ridotte a 3 se attecchiscono
- *Brassica juncea:* 10 semi per vaso e poi eventuale diradamento

13. Trattamenti particolari

13.1 Ciclo redox

Il ciclo redox deve essere iniziato almeno 1 mese dopo la semina. Il livello dell'acqua deve essere almeno 5 cm sopra al suolo, costante e uguale fra tutte le tesi che prevedono ciclo redox e le repliche. I cicli redox devono essere realizzati con un' alternanza di 7 giorni di allagamento seguiti da 7 giorni di drenaggio (Meggo and Schnoor, 2013). Ogni vaso (bucato sul fondo) deve essere inserito in un'altro vaso (non bucato). Ogni vaso esterno deve essere accoppiato solo con il proprio vaso interno. Essi riporteranno entrambi la stessa sigla. Il potenziale redox deve essere misurato ogni giorno durante i periodi di allagamento per verificare che le condizioni siano raggiunte, con il sensore portatile.

13.2 Aggiunta di compost

Aggiungere una quota di terriccio (per semplicità) che contiene mediamente il 20-30% in peso di carbonio organico. Aggiungerne il 25% in peso in modo da triplicare circa il contenuto di carbonio organico (mediamente dell' 1.3 % nelle analisi INDAM). Adattare le quantità a seconda del titolo del terriccio in modo da ottenere un contenuto di carbonio organico pari a 3 volte quello iniziale. Aggiungere il terriccio in modo che la quota (peso o volume) di suolo totale sia uguale a quella degli altri vasi. L'aggiunta di terriccio dovrà essere fatta con un' apposita JSC. A giudicare dai dati della fase 3, il rapporto C/N dei suoli è mediamente 4.5 per cui non occorre aggiungere azoto per favorire la mineralizzazione del carbonio organico (il terriccio ha in genere circa C/N 20, ma verificare).

13.3 Consociazione e panetto

Nel caso delle specie in consociazione *Salix caprea* e *Athyrium filix-femina* le piantule già germinate verranno trasferite con una parte del terreno sul quale erano state piantate dal vivaista. All'atto del trapianto tutto il terreno del panetto (o quote identiche nelle repliche e nei controlli) dovrà essere aggiunto al suolo .

In caso di consociazione di specie erbacee, la densità dovrà essere ridotta e bilanciata per permettere alle due specie di convivere.

13.4 Aggiunta micorrize/rizobio

L'aggiunta di microrganismi ai trattamenti con la pianta è prevista esclusivamente per la tesi con *Medicago sativa*. Utilizzare semi già micorrizati e batterizzati forniti da Continental Semences. Qualche grammo dei prodotti nitragin e rhizomyx che verrano usati dalla azienda da cui verranno acquistati i semi è di interesse come controllo per le analisi microbiologiche e va conservato refrigerato (4 °C).

13.5 Aggiunta tiosolfato

Secondo quanto proposto in letteratura (Wang et al. 2014) si propone l'aggiunta di una soluzione di tiosolfato da somministrare per irrigazione alla coltura di *Brassica juncea* nel momento della

maturità, ma 10 giorni prima del raccolto. La soluzione di tiosolfato va preparata ad una concentrazione tale da somministrare 8 grammi per kilogrammo di suolo. A tal fine è di estrema importanza annotare il peso di ciascun vaso (tesi e relativi controlli) che riceverà l'aggiunta di tiosolfato.

14. Fertilizzazione

Prevedere di aggiungere un fertilizzante inorganico liquido con solo N e K, no P perchè interferisce con l' As e ostacola le radici nell'esplorazione di tutto il suolo presente nel vaso.

Siccome occorre utilizzare lo stesso fertilizzante per tutte le tesi (tranne C1), utilizzare un fertilizzante del tipo illustrato qui:

http://www.ilsagroup.com/it/prodotti/prodotto/17/azoka.htm

E' un fertilizzante NK 8/0/20 (no fosforo) , si chiama AZOKA ed è un concime organo minerale NK pellettato con AZOTO a cessione modulata specifico per colture in ambiente sommerso o molto irrigato. Questo fertilizzante essendo a lenta cessione non viene dilavato facilmente con l'irrigazione e soprattutto nelle tesi REDOX, dove l'acqua verrebbe sgrondata dopo la fase anossica. Permetterebbe poi di fare lo stesso trattamento per tutte le tesi. Non contiene fosforo e questo dovrebbe comportare un maggiore sviluppo dell'apparato radicale.

La proposta è di non usare il fertilizzante al momento della preparazione del vaso ma solo dopo l'emergenza (a plantula cresciuta). In questo modo i controlli al t0 (attualmente chiamati C2, C3, C4) diventerebbero repliche del C1, cosa altamente auspicabile per avere i migliori dati possibili sulla variabilità iniziale delle concentrazioni.

15. Irrigazione

Predisposizone dell' irrigazione e verifica saturazione come frazione della capacità di campo (60-70%). Sarà opportuno dotarsi per quando le piante saranno germinate e cominceranno a crescere di un misuratore portatile della saturazione, in modo da potere tarare più agevolmente l'irrigazione a goccia, al fine di evitare di fare solo colture sommerse o desertiche. Sarebbe il caso di verificare la possibilità di dotare l'impianto di irrigazione di sensori, se possibile dislocati in vari vasi. In tal caso ogni irrigatore dovrà essere sempre usato per il medesimo vaso, evitando possibili fenomeni di cross-contamination.

16. Protezione da parassiti ed erbe infestanti

Si consiglia di non applicare prodotti per la protezione da parassiti; si raccomanda altresì di verificare la presenza ed eliminare periodicamente le eventuali erbe infestanti presenti nei vasi della sperimentazione in serra. Questo lavoro andrà condotto manualmente, al bisogno, da parte dell'operatore. Qualora gli operatori ERSAF, in base alle loro competenze agronomiche, ritenessero necessario il trattamento con antiparassitari, si rimanda alla loro scelta il preparato e le modalità di trattamento con le seguenti indicazioni: a) trattare tutti i vasi della stessa tesi in maniera identica, b) qualora il preparato sia

somministrato non nel suolo ma come aerosol, somministrarlo a tutte le piante della serra data l'impossibilità di confinare il trattamento.

17. Altre misure

- temperatura aria: dovrà essere misurata continuamente in una posizine centrale con un data logger (1 misura/ora)
- pH (all'analisi del suolo)
- potenziale redox: per le tesi che prevedono ciclo redox misurare il potenziale redox all' inizio dell' allagamento e ogni giorno quando allagate.

18. Tipo e numerosità matrici da campionare e analizzare

Per chimica:

- suolo bulk omogenato (SBO) → Quantità: 2 x 500 g preparato con metodo JSC
- radici (R) → Quantità: 2 x 50 g se possibile (non meno di 2x 25 g)
- parte epigea (E) → Quantità: 2 x 50 g se possibile (non meno di 2x 25 g)

NB. Per il t0 della tesi 8 (per la quale è prevista l' analisi della parte epigea e radicale della felce e solo di quella radicale per salice) probabilmente la biomassa radicale ed epigea di 5 piantine di felce (e forse anche di 2 piantine di salice) non saranno sufficienti per preparare tutti i campioni da destinare alle analisi chimiche e microbiologiche, quindi occorrerà procurarsi più piantine (idealmente 5 piantine x 2 repliche per le analisi chimiche e 5 piantine x 1 repliche per le analisi microbiologiche).

Per microbiologia:

- suolo della rizosfera (SRI) → Quantità: 1 x 10 g
- suolo circostante le radici (SSR) → Quantità: 1 x 10 g
- suolo bulk omogenato (SBO) → 1 x 20 g + 5 g
- radici (R) → Quantità: 1 x 10 g
- parte epigea (E) → Quantità: 1 x 10 g

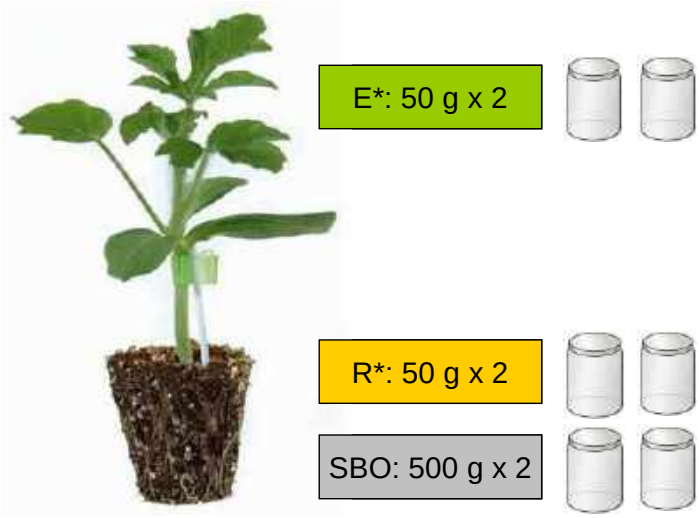
Le matrici da campionare per le analisi chimiche e microbiologiche sono suddivise in due tipologie, ovvero biomassa vegetale e suolo. Per ciascuna specie proposta per la sperimentazione in serra, la biomassa vegetale andrà suddivisa in porzione ipogea (R - radici) e porzione epigea (E), per un totale di 2 frazioni di biomassa vegetale. La quantità di matrice vegetale necessaria alle analisi chimiche è approssimativamente pari a almeno 50 grammi (se possibile) e non meno di 25 grammi per ciascuna matrice, mentre per le analisi microbiologiche sono richiesti circa 10 grammi di matrice vegetale. Si

ricorda che per le tesi con consociazioni di piante si devono prelevare campioni di biomassa vegetale da ciascuna specie. La matrice suolo andrà campionata diversamente in funzione del tipo di analisi da svolgere (chimiche o microbiologiche). Nel caso delle analisi chimiche, esse andranno sempre condotte sul suolo omogenato dopo la rimozione dei tessuti radicali, per un totale di 1 frazione suolo di 500 g (SBO - suolo bulk omogenato). Nel caso delle analisi microbiologiche si intende campionare un numero massimo di 3 frazioni suolo. Il suolo andrà suddiviso, laddove possibile, in rizosfera (10 g) (SRI: suolo più strettamente adeso alle radici, da rimuovere dalla radice grattandolo con una spatola/pinzetta sterilizzata con alcool) e suolo circostante le radici (10 g) (SSR: suolo influenzato dagli essudati radicali, interessato dalla crescita radicale ma facilmente rimovibile attraverso lo scuotimento della pianta dopo la sua eradicazione). Inoltre, per ciascuna specie vegetale, indipendentemente dalla possibilità di separare le frazioni SRI e SSR, andrà sempre raccolto un campione identico (SBO - suolo bulk omogenato) a quello su cui verranno svolte le analisi chimiche (25 g).

Le sigle SBO, SRI e SSR andranno impiegate per riconoscere la frazione “suolo” prelevata, indicando rispettivamente il suolo omogeneizzato, la rizosfera ed il suolo circostante le radici. Le sigle R e E andranno impiegate per riconoscere la frazione “biomassa vegetale” prelevata, indicando rispettivamente il tessuto radicale e quello epigeo.

I campioni raccolti per l'analisi chimica (**Figura 5**) vanno riposti in appositi barattoli di vetro, mentre quelli per l'analisi microbiologica (**Figura 6**) in idonee bustine sterili di plastica (vedere “Protocollo per prelievo campioni di suolo delle fasi 2 e 3 in terreni agricoli del SIN Brescia Caffaro, versione Luglio 2014”). Nel caso del suolo SBO per le analisi microbiologiche un’aliquota pari a circa 5 grammi andrà riposta in una bustina a parte da conservare a 4 °C anziché in freezer. Si ricorda che solo i campioni che andranno destianti alle analisi chimiche dovranno essere prelevati in duplice copia (per i campioni della microbiologia la duplice copia non è necessaria): uno verrà spedito al laboratorio per le misure di contaminanti organici ed inorganici ed uno verrà conservato come campione di controllo/scorta.

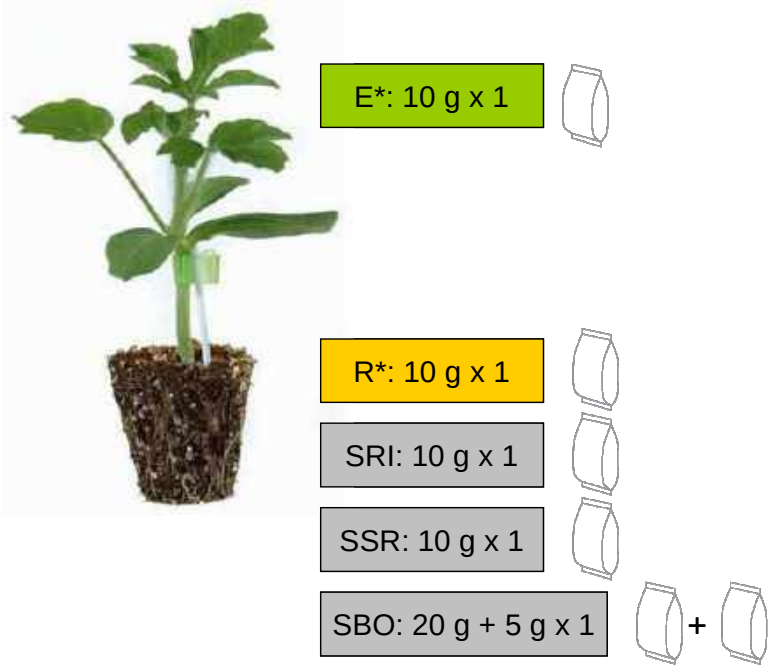
CAMPIONI PER ANALISI CHIMICHE



*** Per le tesi che prevedono consociazione i campioni saranno 4 perchè andranno campionate E e R di entrambe le specie**

Figure 5 - Campioni per le analisi chimiche

CAMPIONI PER ANALISI MICROBIOLOGICHE



*** Per le tesi che prevedono consociazione i campioni saranno 4 perchè andranno campionate E e R di entrambe le specie**

Figura 6 - Campioni per le analisi microbiologiche

Le **Tabelle 1-4** riassumono il numero totale di campioni previsti per i trattamenti e i controlli per le analisi chimiche e microbiologiche per il primo anno di sperimentazione.

Tabella 1- Numero totale campioni trattamenti per analisi chimiche

N° tesi	Descrizione tesi	Matrici per ciascun vaso			Repliche	Totale numero campioni		
		SBO	E	R		t_0	t_1	t_2
1	*Phalaris arundinacea solo pianta*	1	1	1	3	-	9	9
2	*Phalaris arundinacea ciclo redox*	1	1	1	3	-	9	9
3	*Festuca arundinacea solo pianta*	1	1	1	3	-	9	9
4	*Festuca arundinacea consociazione con Cucurbita pepo spp pepo*	1	2	2	3	-	15	15
5	*Festuca arundinacea ciclo redox*	1	1	1	3	-	9	9
6	*Festuca arundinacea aggiunta compost (DOC producer)*	1	1	1	3	-	9	9
7	*Medicago sativa micorrize e rizobio*	1	1	1	3	-	9	9
8	*Salix caprea consociazione con Athyrium filix-femina*	1	2	2	3	9 *	15	15
9	*Brassica juncea*	1	1	1	3	-	9	9
10	*Brassica juncea tiosolfato*	1	1	1	3	-	9	9

***NB:** Per la tesi 8 al t0 non è prevista l'analisi di SBO e della parte epigea (E) del salice

Tabella 2- Numero totale campioni controlli per analisi chimiche (*:non previsti campioni di foglie)

N° controlli	Descrizione controlli	Matrici per ciascun vaso			Repliche	Totale numero campioni		
		SBO	E	R		t_0	t_1	t_2
C1	suolo contaminato senza pianta e non fertilizzato	1	-	-	3	12*	3	3
C2	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato	1	-	-	3		3	3
C3	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con ciclo redox	1	-	-	3		3	3
C4	suolo contaminato senza pianta me fertilizzato e con aggiunta tiosolfato	1	-	-	3		3	3
C5	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con aggiunta compost	1	-	-	3	3	3	3
C6	suolo non contaminato con pianta e fertilizzato (*Medicago sativa + Festuca arundinacea)*	1	2	-	3	3**	9	9
C7	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato e con panetto/i di terra	1	-	-	3	3	3	3

NB: *Per i controlli C1, C2, C3 e C4 al t0 sono tutte repliche da considerarsi suolo contaminato senza pianta e non fertilizzato; **Per il controllo C6 al t0 non sono previsti i campioni di biomassa epigea in quanto non presenti

Tabella 3- Numero totale campioni trattamenti per analisi microbiologiche

N° tesi	Descrizione tesi	Matrici per ciascun vaso					Repliche	Totale numero campioni		
		SBO**	SRI	SSR	E	R		t_0	t_1	t_2
1	*Phalaris arundinacea solo pianta*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)
2	*Phalaris arundinacea ciclo redox*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)
3	*Festuca arundinacea solo pianta*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)
4	*Festuca arundinacea consociazione con Cucurbita pepo spp pepo*	1+1	2	1	2	2	3		24 (+3)	24 (+3)
5	*Festuca arundinacea ciclo redox*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)
6	*Festuca arundinacea aggiunta compost (DOC producer)*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)
7	*Medicago sativa micorrize e rizobio*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)
8	*Salix caprea consociazione con Athyrium filix-femina*	1+1	2	1	2	2	3	9*	24 (+3)	24 (+3)
9	*Brassica juncea*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)
10	*Brassica juncea tiosolfato*	1+1	1	1	1	1	3		15 (+3)	15 (+3)

***NB:** Per la tesi 8 al t0 non è prevista l'analisi di del SBO, SRI, SSR e della parte epigea (E) del salice; * Ricordarsi che per SBO dovranno essere prelevati anche 5 g di suolo per ogni replica e per ogni tempo che andranno conservati in frigo.

Tabella 4- Numero totale campioni controlli per analisi microbiologiche

N° controlli	Descrizione controlli	Matrici per ciascun vaso					Repliche	Totale numero campioni		
		SBO***	SRI	SSR	E	R		t_0	t_1	t_2
C1	suolo contaminato senza pianta e non fertilizzato	1+1	-	-	-	-	3	12* (+12)	3 (+3)	3 (+3)
C2	suolo contaminato senza pianta ma fertilizzato	1	-	-	-	-	3		3 (+3)	3 (+3)
C3	suolo contaminato senza pianta ma con ciclo redox	1	-	-	-	-	3		3 (+3)	3 (+3)
C4	suolo contaminato senza pianta ma con tiosolfato	1	-	-	-	-	3		3 (+3)	3 (+3)
C5	suolo contaminato senza pianta ma con aggiunta compost	1	-	-	-	-	3	3	3 (+3)	3 (+3)
C6	suolo non contaminato con pianta (*Medicago sativa + Festuca arundinacea)*	1	-	-	2	-	3	3**	9 (+3)	9 (+3)
C7	suolo contaminato senza pianta ma con panetto di terra	1	-	-	-	-	3	3	3 (+3)	3 (+3)

NB: *Per i controlli C1, C2, C3 e C4 al t0 sono tutte repliche da considerarsi suolo contaminato senza pianta e non fertilizzato; **Per il controllo C6 al t0 non sono previsti i campioni di biomassa epigea in quanto non presenti; *** Ricordarsi che per C1, SBO dovranno essere prelevati anche 5 g di suolo per ogni replica e per ogni tempo che andranno conservati in frigo.

19. Etichettatura contenitori campioni

Si rimanda al “Protocollo per prelievo campioni di suolo delle fasi 2 e 3 in terreni agricoli del SIN Brescia Caffaro” (versione Luglio, 2014). Qui vengono riassunte le fasi principali da prendere in considerazione.

Etichettatura dei barattoli per campionamento

Prima della chiusura del contenitore in vetro, deve essere interposto tra vaso e coperchio un film di alluminio per evitare il contatto tra il campione e la guarnizione del coperchio.I campioni devono essere contrassegnati ognuno con un proprio identificativo. Le sigle che andranno riportate sui contenitori saranno le stesse riportate sui vasi a cui verrà aggiunta la sigla del tipo di matrice (E, R, SBO) e del tipo di campione (LAB per quelli destinati alle analisi in laboratorio e STOCK per quelli da conservare come controllo/scorta). Si consiglia di usare etichette (adesive) prestampate, fissate poi sui barattoli con scotch trasparente di larghezza > 4 cm facendo un giro completo attorno al barattolo per evitare il distacco. Tutti i campioni raccolti devono poi essere imbustati in sacchetti di plastica di colore nero per garantirne la conservazione in caso di rottura accidentale dei contenitori e per proteggerli dai raggi solari e nuovamente etichettati con etichetta di cartoncino compilata con biro nera o blu (verificare che inchiostro resista all’acqua). L’etichetta viene legata al sacchetto contenete il barattolo con un apposito cordoncino. I barattoli devono essere conservati in contenitori refrigerati (+ 4 °C) fino al conferimento giornaliero in laboratorio. Ogni singolo campionamento viene completato con la redazione di un’apposita scheda di campionamento (catena di custodia), e corredato da documentazione fotografica.

Etichettatura dei sacchetti per campionamento

Le bustine per analisi microbiologiche possono essere marcate direttamente nella parte bianca con pennarello indelebile, attenzione a marcarle PRIMA di riempirle. Usare pennarelli a punta fine che consentano una identificazione inequivocabile della sigla ivi riportata. I sacchetti devono essere siglati allo stesso modo di cui alla sezione precedente, indicando il tipo di matrice (nel caso delle analisi microbiologiche: E, R, SBO, SRI, SSR) e accompagnati da etichetta di cartoncino compilata e fissata al sacchetto come sopra.

20. Riempimento dei vasetti/sacchetti con SBO

Si rimanda al "Protocollo per preparazione ed omogeneizzazione del suolo per esperimenti di *rhizoremediation* in vaso". (Versione 1.34 (???) Aprile 2015). Si riassumono di seguito le parti principali da prendere in considerazione.

Omogenizzazione per costituzione vasetti/sacchetti

Il contenuto di ogni vaso dopo essere stato setacciato a 2 mm per separare le radici e il detrito eventuale e omogenato nell'insalatiera dovrà essere ridotto in aliquote più piccole per la preparazione del vasetto da campionamento. Tale operazione andrà effettuata su un tavolo o una superficie simile piana, con le modalità della JSC.

La JSC che verrà allestita avrà le seguenti dimensioni: 2 cm di altezza, 20 di larghezza e 150 di lunghezza, corrispondente al volume del terreno contenuto in un vaso (6.000 cm^3 ovvero 6 litri). Per prelevare il suolo verrà utilizzata una paletta di dimensioni interne di cm 2.0 (altezza) x cm 1.7 (larghezza)

x cm 5.0 (lunghezza) ottenendo un prelievo di 17 cm^3 . Con 32 prelievi si ottengo quindi un volume di terreno pari 544 cm^3 che costituisce il campione da inviare al laboratorio o il suo duplicato. Entrambi verranno collocati in vasetti da cm^3 580 che verranno chiusi interponendo un sottile foglio di alluminio. In termini pratici dalla JSK 150 x 20 x 2 formata sul piano si prelevano, dalla prima striscia larga 5 cm (prossima all'operatore), 8 "cucchiaiate" di terreno che vengono messe nel vaso del campione e 8 che vengono messe nel vaso della replica. Si allontana il terreno residuo della prima striscia di 5 cm e si prelevano altre 8 + 8 cucchiaiate dalla seconda striscia di 5 cm e così via fino ad esaurimento delle 4 strisce teoriche di terreno. Si otterranno così le 32 cucchiaiate necessarie per ogni vasetto. In sostanza è come realizzare una lunga JSC di cm 2 x 5 x 600. Se il volume del terreno in ogni vaso sarà inferiore ai 6 litri verrà ridotta proporzionalmente la lunghezza della JSC in modo che il volume complessivo sia corrispondente. Come detto sopra, prima della preparazione della JSC il terreno andrà setacciato a 2 mm, salvo nel t0 nel quale il terreno risulta appena setacciato dalla ditta GEOLAB.

Prima di inserirle nel vasetto le frazioni andaranno miscelate accuratamente nell'insalatiera metallica più piccola. Questa operazione va ripetuta per ogni campione (vaso). Occorre lavare l'insalatiera fra un campione e l'altro.

Per i campioni microbiologici non è necessaria la JPS. Il campione può essere preso post-setacciatura e post-omogeneizzazione nell'insalatiera, che dovrà essere lavata tra un campione e l'altro, con un cucchiaio lavato con acqua e carta imbevuta di alcol prima di ogni prelievo. Inoltre per la pulizia degli strumenti usati (cucchiaio/spatola/pinzetta) tra un campionamento microbiologico e quello successivo sarà necessario predisporre un contenitore con alcool denaturato e accendino per poter sterilizzare mediante fiamma.

21. Esecuzione controlli al t_0

I controlli 1, 2, 3, 4 al tempo 0 non occupano vasi. Essi sono da considerarsi tutti dei "controlli suolo contaminato senza pianta non fertilizzato" in quando i trattamenti con fertilizzante, ciclo redox, tiosolfato, verranno effettuati in una fase successiva.Quindi si avranno un totale di 12 repliche di suolo contaminato senza pianta non fertilizzato che daranno un' indicazione della varianza del suolo di base. Anche i controlli 5 e 7 (aggiunta di compost, aggiunta panetto) non occupano vasi al t0: sia il compost che i panetti andranno miscelati al terreno. Anche per il controllo 7 (suolo non contaminato) non occorrerà allestire i vasi del t0.

22. Campionamento (t_0, t_1 , t_2, t_3, , t_4)

Di seguito vengono riassunte le fasi per il campionamento delle diverse matrici ai vari tempi. E' importante indossare guanti non talcati che andranno sostituiti ad ogni campione.

1. Tagliare la parte epigea.
2. Separare le radici dal suolo.
3. Per le specie vegetali in cui è possibile la suddivisione di suolo della rizosfera (SRI) e suolo circostante le radici (SSR) tali frazioni andranno campionate per le analisi microbiologiche. La procedura prevede che, una volta eradicata

delicatamente la pianta, essa venga scossa al fine di consentire la caduta del suolo SSR e raccogliere circa 10 grammi di campione. La pianta andrà scossa su un foglio di carta oleata previamente sterilizzato mediante autoclavatura (FARE AUTOCLAVARE DA UNIMI). Una volta rimosso il suolo circostante le radici (SSR) l'operatore dovrà campionare il suolo rizosferico (SRI) che è strettamente adeso alle radici. Tale frazione andrà rimossa dalla radice grattandolo con una spatola/pinzetta sterilizzata con alcool. Anche in questo caso il campione andrà pesato su un foglio di carta oleata previamente sterilizzato mediante autoclavatura. Sarà pertanto necessario predisporre un contenitore con alcool denaturato e accendino per poter sterilizzare mediante fiamma gli strumenti usati (spatola/pinzetta), tra un campionamento e quello successivo. Questa procedura non riguarda il campionamento del T0.

4. Solo per i campioni da destinare alle analisi chimiche lavare la parte epigea e le radici con acqua distillata per eliminare le particelle di suolo e scuoterle per eliminare l'acqua in eccesso. Se necessario asciugare con carta assorbente non colorata e senza disegni che verrà cambiata ogni volta.

5. Pesare parte epigea e radici per determinare la biomassa con bilancia tecnica, riporatre i valori su log book.

6. Prendere un campione rappresentativo di biomassa radicale ed epigea da destinare alle analisi chimiche (in duplice copia) e microbiologiche (in singola copia) e metterlo negli appositi vasetti (per analisi chimiche)/sacchetti sterili (per analisi microbiologiche). Il quantitativo necessario per ciascun tipo di frazione è riportato nei paragrafi precedenti.

7. Setacciare il suolo a 2 mm. Se delle radici fini si fermano sul setaccio pesarle e addizionare il peso a quello precedentemente determinato.

8. Procedere alla omogenizzazione e alla riduzione del campione di suolo del vaso secondo la tecnica del japanese slab cake (solo per chimica) per riempire i vasetti (per analisi chimiche)/ sacchetti sterili (per analisi microbiologiche) da destinare alle analisi chimiche/microbiologiche. Anche il suolo SBO andrà pesato su un foglio di carta oleata previamente sterilizzato mediante autoclavatura.

23. Conservazione dei campioni

I campioni prelevati in serra devono essere riposti appena possibile in apposito contenitore isolato e refrigerato. I campioni vengono poi congelati in freezer. Alcuni campioni destinati alle analisi microbiologiche dovranno essere invece conservati in frigo.

24. Fotografie

Per ogni tesi: fotografare le piante (triplicati) ancora nel vaso, vicino al rispettivo controllo (in triplicato). Fotografare pianta più terra fuori dal vaso, così che si veda il grado di colonizzazione del suolo da parte delle radici.

25. Contaminanti da ricercare e altre analisi

Tutti i contaminati che durante Fase 1, 2, 3 sono risultati essere fuori dal limite di legge (?)

26. Catena di custodia

Occorre campionare la scheda per la catena di custodia per ogni prelievo e conservazione in freezer/frigo.

27. Registro della sperimentazione

Occorrerà realizzare un registro cartaceo (idelamente un quaderno con fogli A4 NON AD ANELLO O STACCABILI, MA TUTTI TENUTI INSIEME) della sperimentazione dove dovranno essere annotate (con biro non matita e in caso di errore si tira una riga sopra) tutte le operazioni effettuate e da chi (irrigazione, fertilizzazione), i valori misurati (temperatura, potenziale redox, ph), le foto scattate etc.. Deve riportare non tutte le singole operazioni sui singoli vasi ma le cosa effettuato generalmente (es. operazione di irrigazione dalle 10 alle 12) e cosa invece viene fatto in particolare (es. rimosso infestante dal vaso n°...). Deve riportare anche le cose che accadono nella serra (es. temperatura troppo alta) o nei dintorni (es. i trattamenti nel vigneto a fianco). Da questo quaderno i dati verranno trasferiti in appositi file. I file dei datalogger vengono acquisiti direttamente. Se si dovesse scoprire ad un certo punto che qualche cosa non torna o si dovesse investigare sulle date di una certa operazione avremmo accesso al "log book".

Allegato 4 - Scambio mail con ISPRA

Subject: Dati concentrazioni campioni di suolo in esperimento Vasi
From: Antonio Di Guardo <antonio.diguardo@uninsubria.it>
Date: 24-Oct-16 08:52
To: Nastasio Paolo <Paolo.Nastasio@ersaf.lombardia.it>, Anelli Simone <Simone.Anelli@ersaf.lombardia.it>, Elisa Terzaghi <elisa.terzaghi@uninsubria.it>, Morosini Cristiana <cristiana.morosini@uninsubria.it>, Zanardini Elisabetta <elisabetta.zanardini@uninsubria.it>, Sara Borin <sara.borin@unimi.it>, Francesca Mapelli <francesca.mapelli@unimi.it>, Giuseppe Raspa <giuseppe.raspa@uniroma1.it>
CC: Sale Vanna Maria <Vannamaria.Sale@ersaf.lombardia.it>, Botanica <Botanica@comune.brescia.it>, Paolo Casciano <paolo_casciano@regione.lombardia.it>, <stefania.balzamo@isprambiente.it>

Cari componenti del GdL BS-Caffaro,

vi inoltriamo uno scambio di corrispondenza avvenuto tra noi e la **Dr.ssa Stefania Balzamo** (in copia), del **Servizio di Metrologia Ambientale dell'ISPRA** di Roma, alla quale avevamo chiesto lumi sui risultati delle analisi di suoli degli esperimenti in vaso per PCB, PCDD/Fs, che mostrano dei coefficienti di variazione, sulle concentrazioni in repliche indipendenti, estremamente bassi . Il **Servizio di Metrologia Ambientale dell'ISPRA** (http://www.isprambiente.gov.it/it/i-laboratori-ispra/metrologia-ambientale) come riportato dal loro sito: "I laboratori del Servizio di Metrologia Ambientale assicurano la confrontabilità e l'accuratezza dei dati analitici derivanti dalle attività di monitoraggio/controllo ambientale ". Per questo motivo essi sono l'ente di riferimento più "istituzionale" che quindi può garantire una *guidance* imparziale per potere comprendere la validità dei dati prodotti, ai fini delle elaborazioni successive.

Dalla mail della Dott.ssa Balzamo e dai dati da lei riportati si evince che "Per i PCB analizzati mediante GC-MS la media dei CV% sulla ripetizione delle rette di taratura (quindi solo strumentale) varia tra 5 e 10%" mentre su PCBdl, PCDD/Fs il coefficiente di variazione percentuale medio va da circa il 5 % all' 8.7%. Ricordiamo che questa variabilità è riferita solo a quella **strumentale**, ovvero legata alla **misura di standard di PCB, PCDD/Fs in solvente** e rappresenta le condizioni ideali, **minime**, del CV. Quando intervengono attività di preparazione, estrazione e purificazione ambientale di un campione (anche in presenza di tecniche come la Japanese Slab Cake), la **variabilità può solo crescere.** In presenza anche di **ripetizioni indipendenti** (i singoli vasi di ogni trattamento) **occorre considerare una variabilità aggiuntiva**: quella **biologica** (sviluppo di pianta, suo apparato radicale, flora batterica in rizosfera) e quella legata alle **operazioni "colturali"** (irrigazione, misura potenziale redox, umidità). Ovvero il valore di CV % **deve essere necessariamente maggiore del 5-10%.**

I valori prodotti dal laboratorio mostrano dei **coefficienti di variazione straordinariamente bassi** (di seguito i valori al T2; i controlli (T0) non si discostano di molto). Ad esempio sono state calcolati i CV delle repliche per tutti i trattamenti e tutti i congeneri che presentano un CV ≤ 3% e ≤ 5%.

PCBs

il **66%** dei campioni ha **CV** delle repliche ≤ **5%** e il **41%** dei campioni ha **CV ≤ 3%**,

PCDFs

il **71%** dei campioni ha **CV** delle repliche ≤ **5%.** Il **58%** dei campioni ha **CV≤ 3%**,

PCDDs

Il **20%** dei campioni ha **CV** delle repliche **≤ 5%** e il **10%** dei campioni ha **CV≤ 3%**,

Stante le valutazioni sopra esposte **appare improbabile che numeri così importanti** (il 66-71% dei campioni) **possano avere avere variabilità così bassa** e **testimoniano di anomalie evidenti**. Nel caso dei PCDD la variabilità più alta può dipendere dai livelli di diossine considerevolmente più bassi rispetto ai furani.

Ritengo che vista la disponibilità della Dott.ssa Balzamo a visionare i dati prodotti dal laboratorio, possa essere di ausilio un confronto ulteriore con i colleghi di ISPRA, sebbene le evidenze fin qui mostrate mostrino, come detto, delle anomalie importanti.

Cordialmente

Antonio Di Guardo e Giuseppe Raspa

-------- Forwarded Message --------
Subject:R: R: Richiesta di consulto
Date: Thu, 20 Oct 2016 15:22:10 +0200
From: Stefania Balzamo <stefania.balzamo@isprambiente.it>
To:'Antonio Di Guardo' <antonio.diguardo@uninsubria.it>
CC:'Giuseppe Raspa' <giuseppe.raspa@uniroma1.it>

Buongiorno.

Può sicuramente girare la mia mail al gruppo di lavoro e ai suoi colleghi. Spero di essere stata sufficientemente chiara nella spiegazione altrimenti chiedo a lei di specificare meglio alcuni termini.

Cordiali saluti

Stefania Balzamo

Stefania Balzamo

ISPRA (Italian Environmental Protection Agency)

Servizio di Metrologia Ambientale

Via di Castel Romano,100

00128 Roma

Da: Antonio Di Guardo [mailto:antonio.diguardo@uninsubria.it]
Inviato: lunedì 17 ottobre 2016 18:25
A: Stefania Balzamo
Cc: 'Giuseppe Raspa'
Oggetto: Re: R: Richiesta di consulto

Buongiorno Dott.ssa Balzamo,

grazie per la sua mail. In effetti i numeri che lei riporta sono quelli che ci attendiamo dalle repliche strumentali.

Sarebbe utile a questo punto poter inviare la sua mail per conoscenza al gruppo di lavoro BS-CAFFARO costituito da persone dell'ERSAF (Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste) di Regione Lombardia (Dr. Nastasio, Dr. Anelli e Dott.ssa Sale), del Museo Di Scienze Naturali di BS (Dr. Armiraglio) e dai colleghi dell'Università dell'Insubria (Morosini e Zanardini) oltre che dell'Università di Milano (Borin e Mapelli) e ovviamente a lei in copia.

Qui trova una descrizione dei componenti principali del Gruppo di Lavoro (http://www.ersaf.lombardia.it/servizi/Menu/dinamica.aspx?idSezione=16926&idArea=32247&idCat=32251&ID=32254)

Chiederei quindi la sua autorizzazione all'invio della mail in modo tale da poter quantificare, almeno a livello generale, le perplessità emerse e magari, in un secondo momento, vedere i dati con lei potendo valutare i diversi risultati . Ne approfitteremmo per illustrarle la procedura che abbiamo selezionato per ridurre la variabilità durante le fasi di campionamento. Può trovare comunque una breve descrizione schematica con foto qui: http://www.ersaf.lombardia.it/upload/ersaf/gestionedocumentale/PreparazionedelsuoloperesperimentidirizoremedioinvasoÌ784Ì23684.pdf

Grazie e cordiali saluti

Antonio Di Guardo

On 17-Oct-16 10:13, Stefania Balzamo wrote:

> Buongiorno.
>
> Come le ho anticipato per le vie brevi, le invio alcune considerazioni sulla ripetibilità di misure di PCB, diossine e furani. Per i PCB analizzati mediante GC-MS la media dei CV% sulla ripetizione delle rette di taratura (quindi solo strumentale) varia tra 5 e 10%. Di seguito le invio alcuni dati di CV% sulle rette dei PCB dl, diossine e furani eseguite su HRGC-HRMS. Come può vedere i CV% variano fino a un massimo del 15% considerando solo la parte strumentale. Se a questi dati di ripetibilità si aggiunge la variabilità dovuta all'estrazione e alla purificazione del campione di suolo o del vegetale è ovvio che la ripetibilità finale non può essere più bassa. Non stiamo comunque parlando di incertezza che ovviamente sarebbe ancora più alta (si dovrebbe considerare l'apporto dovuto alla pesata, all'uso delle micro pipette etc.) oppure utilizzare almeno 3 o meglio 5 misure indipendenti

per ogni campione. Se vuole possiamo anche vedere insieme i dati che ha ricevuto e, richiedendo ulteriori precisazioni sul metodo utilizzato dal laboratorio privato, potremmo capire se ci sono ulteriori problematicità nell'analisi.

Cordiali saluti

Stefania Balzamo

PCBdl n°	RF CV [%]
81	2.9
77	2.4
123	2.8
118	26.1
114	3.4
105	10.8
126	2.6
167	9.5
156	4.6
157	2.5
169	2.7
189	3.2
81L	2.3
77L	3.1
123L	2.5
118L	3
114L	2.7
105L	2.4
126L	2.8
167L	13.7
156L	4.4
157L	3.1
169L	4.3
189L	6.2

Retta PCBdl 0.1-200 ppb; L= labelled

	Lim inf retta (ppb)	Lim sup retta(ppb)	RF CV (%)
2378-TCDF	0.1	200	7.10
2378-TCDD	0.1	200	3.30
12378-PeCDF	0.5	1000	8.40
23478-PeCDF	0.5	1000	8.70
12378-PeCDD	0.5	1000	5.20
123478-HxCDF	0.5	1000	9.70
123678-HxCDF	0.5	1000	10.10
234678-HxCDF	0.5	1000	9.90
123789-HxCDF	0.5	1000	9.30

123478-HxCDD	0.5	1000	6.00
123678-HxCDD	0.5	1000	6.10
123789-HxCDD	0.5	1000	8.50
1234678-HpCDF	0.5	1000	10.30
1234789-HpCDF	0.5	1000	7.80
1234678-HpCDD	0.5	1000	5.20
OCDF	1.0	2000	14.70
OCDD	1.0	2000	15.80
2378-TCDF 13C12 STD	100		2
2378-TCDD 13C12 STD	100		4.6
12378-PeCDF 13C12 STD	100		9.2
23478-PeCDF 13C12 STD	100		9.8
12378-PeCDD 13C12 STD	100		8.4
123478-HxCDF 13C12 STD	100		10.4
123678-HxCDF 13C12 STD	100		10.6
234678-HxCDF 13C12 STD	100		8.2
123789-HxCDF 13C12 STD	100		8.5
123478-HxCDD 13C12 STD	100		10.8
123678-HxCDD 13C12 STD	100		9.3
1234678-HpCDF 13C12 STD	100		8.3
1234789-HpCDF 13C12 STD	100		9.3
1234678-HpCDD 13C12 STD	100		8.8
OCDD 13C12 STD	200		15.8
CLEAN-UP			
2378-Cl37-TCDD	0.1	200	3.2

Stefania Balzamo

ISPRA (Italian Environmental Protection Agency)

Servizio di Metrologia Ambientale

Via di Castel Romano,100

00128 Roma

Da: Antonio Di Guardo [mailto:antonio.diguardo@uninsubria.it]
Inviato: giovedì 13 ottobre 2016 17:26
A: stefania.balzamo@isprambiente.it
Cc: Giuseppe Raspa
Oggetto: Richiesta di consulto

Buongiorno Dr.ssa Balzamo,

sono un docente dell'Università dell'Insubria di Como e mi occupo di modellistica

ambientale e in generale del destino ambientale di contaminanti organici. Sono stato nel passato consulente di APAT (insieme al collega Giuseppe Raspa de La Sapienza-Università di Roma) occupandomi della parte modellistica nel contesto del caso "Diossina in Campania" e coautore di un capitolo nel volume Quaderni 1/2012 "DIOSSINE, FURANI E POLICLOROBIFENILI Indagine ambientale nella Regione Campania" edito da ISPRA, in cui lei ed il suo ufficio hanno fornito contributi.

Da qualche anno sono consulente scientifico (insieme al Prof. Raspa e altri colleghi dell'Università di Milano) per un ente della Regione Lombardia (ERSAF) che si deve occupare di progettare la bonifica delle aree agricole del sito di interesse nazionale Brescia-Caffaro, che come saprà è contaminato da PCB, Diossine, Furani, arsenico e mercurio. Le scrivo perché nel valutare alcuni risultati di analisi effettuate da un laboratorio commerciale su suoli e biomasse per le sostanze sopra elencate sono emerse delle perplessità sui risultati, che mostrano dei coefficienti di variazione estremamente bassi sulle concentrazioni in repliche indipendenti di esperimenti in vaso.

Vista la vostra esperienza ed il ruolo istituzionale che rivestite in questi aspetti metrologici vorrei *in primis* scambiare due parole con lei per valutare se sia possibile fornirci un ausilio tecnico in questo processo. Se mi può dare un numero di telefono ed un orario a lei confacente, possiamo sentirci così che possa fornirle qualche dettaglio in più.

Ringraziandola per l'attenzione, le invio i miei più cordiali saluti.

Antonio Di Guardo

--

****

Prof. Antonio Di Guardo

Department of Science and High Technology

University of Insubria

Via Valleggio 9

22100 COMO CO

ITALY

****

Tel: +39-031-2386480

Fax. +39-031-2386449

e-mail: antonio.diguardo@uninsubria.it

****

--

****

Prof. Antonio Di Guardo

Department of Science and High Technology

University of Insubria

Via Valleggio 11

22100 COMO CO

ITALY

****

Tel: +39-031-2386480

Fax. +39-031-2386449

e-mail: antonio.diguardo@uninsubria.it

****

--

****
Prof. Antonio Di Guardo
Department of Science and High Technology
University of Insubria
Via Valleggio 9
22100 COMO CO
ITALY
****
Tel: +39-031-2386480
Fax. +39-031-2386449
e-mail: antonio.diguardo@uninsubria.it

****

Allegato 5 - Verbale interno incontro con ISPRA

Verbale interno dell'incontro con staff Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA – Roma

Presenti all'incontro per ISPRA

- Dott.ssa Stefania Balzamo
- Dott.ssa Sabrina Barbizzi
- Dott.ssa Monica Potalivo
- Dott Paolo De Zorzi

Presenti all'incontro per GDL Brescia Caffaro

- Prof. Antonio Di Guardo UNINS
- Prof. Giuseppe Raspa UNIROMA1
- Dott.ssa Vanna Maria Sale ERSAF

La riunione si è svolta presso la sede ISPRA di via Castel Romano 100, RM il 15 novembre 2016 dalle ore 11.30 alle 14.00.

Dopo un'iniziale introduzione per fornire elementi conoscitivi del contesto il Prof. Di Guardo è entrato nel merito della questione, ed ha illustrato il confronto dei dati analitici dei campioni di suolo mediante la presentazione mostrata in precedenza alla riunione del GdL del 20.04.2016. Successivamente ha illustrato un'analisi sintetica dei risultati in forma di istogramma e di curva cumulata, elaborata dal Prof. Raspa, allo scopo di meglio evidenziare i problemi di scarsa variabilità dei trattamenti e dei controlli.

In particolare si è evidenziato come una quota importante dei dati abbia dei coefficienti di variazione inferiori al 5%, numero, evidenziato anche nello scambio di mail precedente con la Dott.ssa Balzamo, come la minima variabilità analitica riscontrabile nelle misure di PCB, diossine e furani.

Il gruppo "ISPRA" nella sua totalità ha ritenuto che i dati mostrati (stampe dei file dei dati analitici sui campioni di suolo T0 e T2 inviati da Indam in data 10.03.2016) presentino una variabilità anomala in quanto molto al di sotto di quella normalmente riscontrata nella pratica e nella letteratura analitica internazionale.

La Dott.ssa Potalivo ha riferito che nella sua pratica di laboratorio, per questo tipo di sostanze, la sola variabilità analitica (ovvero quella che si ricava iniettando lo stesso standard più volte) possa produrre coefficienti di variazione intorno al 15%.

In generale il gruppo "ISPRA" ha concordato sul fatto che la variabilità complessiva risultante dal completo trattamento del campione (campionamento, preparazione, estrazione, purificazione, analisi strumentale) debba essere superiore a quella solo analitica. Pertanto, il loro parere informale supporta il giudizio sulle anomalie rilevate in merito alla estrema improbabilità di ottenere una variabilità così bassa come quella che si ricava dai dati Indam.

Alla presa visione dei dati di incertezza dei campioni T0 e T2 (generalmente attestantesi attorno al 40%) hanno riscontrato un'incongruenza rispetto alla bassa variabilità delle repliche dei risultati finali (<5%).

Come indagini successive hanno suggerito di chiedere a Indam il rapporto di validazione (che riporta valori e modalità di calcolo dell'incertezza, della riproducibilità e bias) e, visto il loro accreditamento e le richieste specificate nel bando di gara, anche i dati sulle analisi del materiale di riferimento certificato (CRM o MRC), e in particolare della sua variabilità. Hanno suggerito inoltre di chiedere informazioni anche sulla ripetibilità strumentale e su alcune particolarità, come la modalità di integrazione dei picchi (manuale o automatica)

ed eventualmente ottenere per alcuni trattamenti e le loro ripetizioni i file dei cromatogrammi prodotti dagli strumenti.

Hanno suggerito inoltre, come possibile prova successiva, la ripetizione del 10% delle analisi da parte di ARPA in quanto ente di riferimento territoriale che possa certificare la validità dei risultati.

Tuttavia, vista la delicatezza della problematica, l'importanza dell'uso di questi dati nel contesto della bonifica del SIN Brescia – Caffaro, e vista anche la complessità giuridica e temporale di una controversia legale con Indam, hanno suggerito di utilizzare le clausole di rescissione presenti nel bando di gara legate al mancato rispetto dei tempi di consegna consigliando infine di non conferire a Indam ulteriori campioni.

Firmato:

Antonio Di Guardo

Vanna Maria Sale

Giuseppe Raspa

Analisi dei coefficienti di variazione in campioni di suolo dei tempi T0 e T2

Antonio Di Guardo*, Elisabetta Zanardini*, Cristiana Morosini*, Elisa Terzaghi*,
Sara Borin**, Francesca Mapelli**
Giuseppe Raspa***

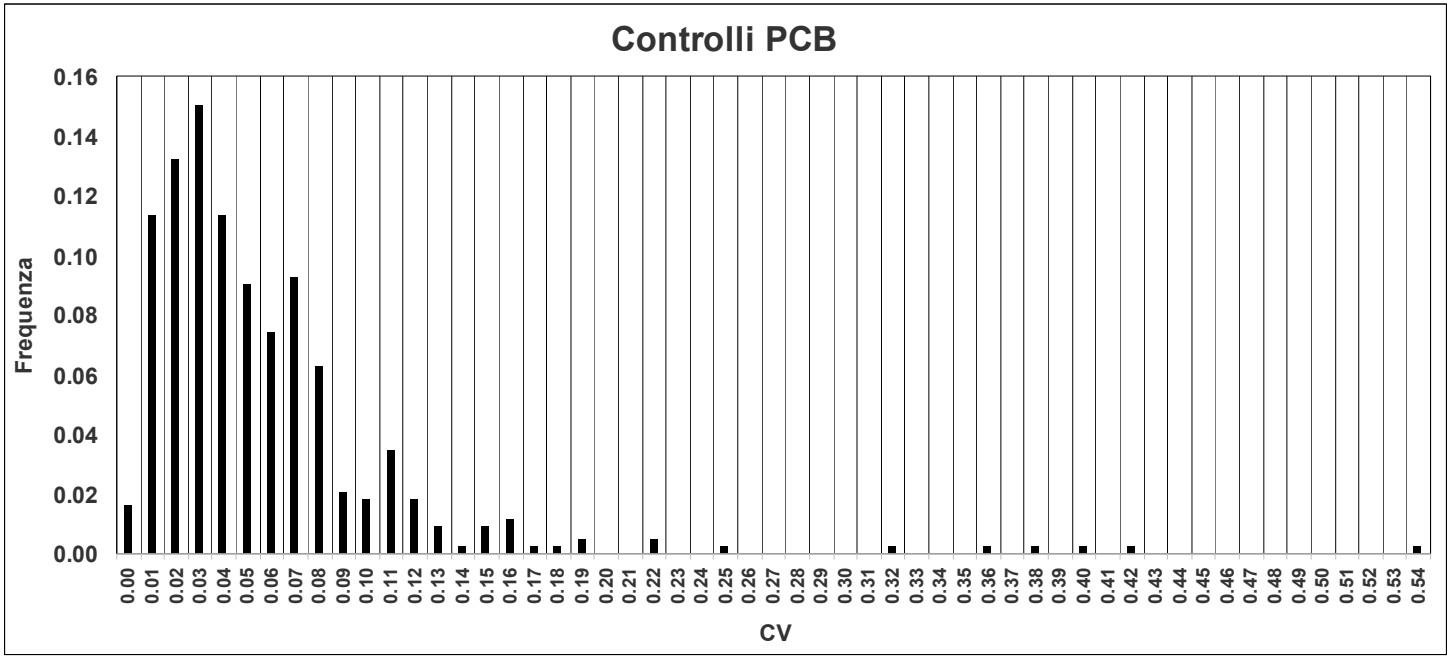
* Università degli Studi dell'Insubria
** Università degli Studi di Milano
***La Sapienza Università di Roma

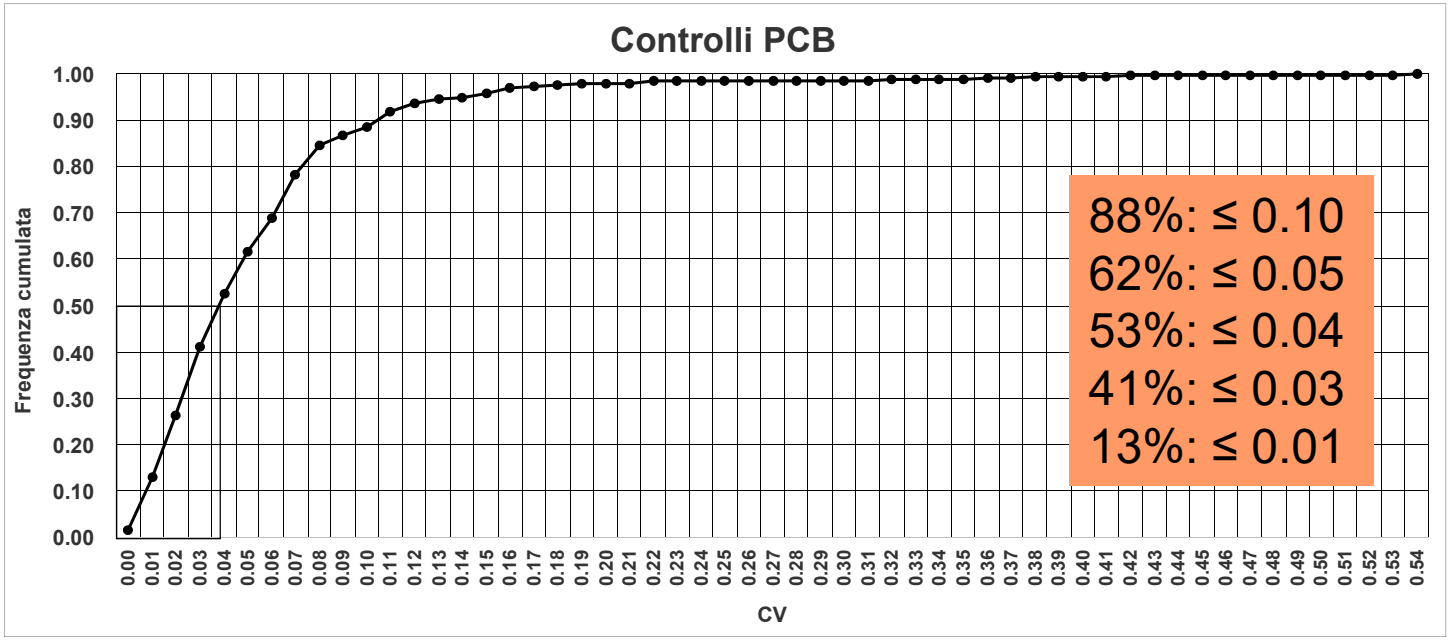
GdL Brescia Caffaro Milano, 30 novembre 2016

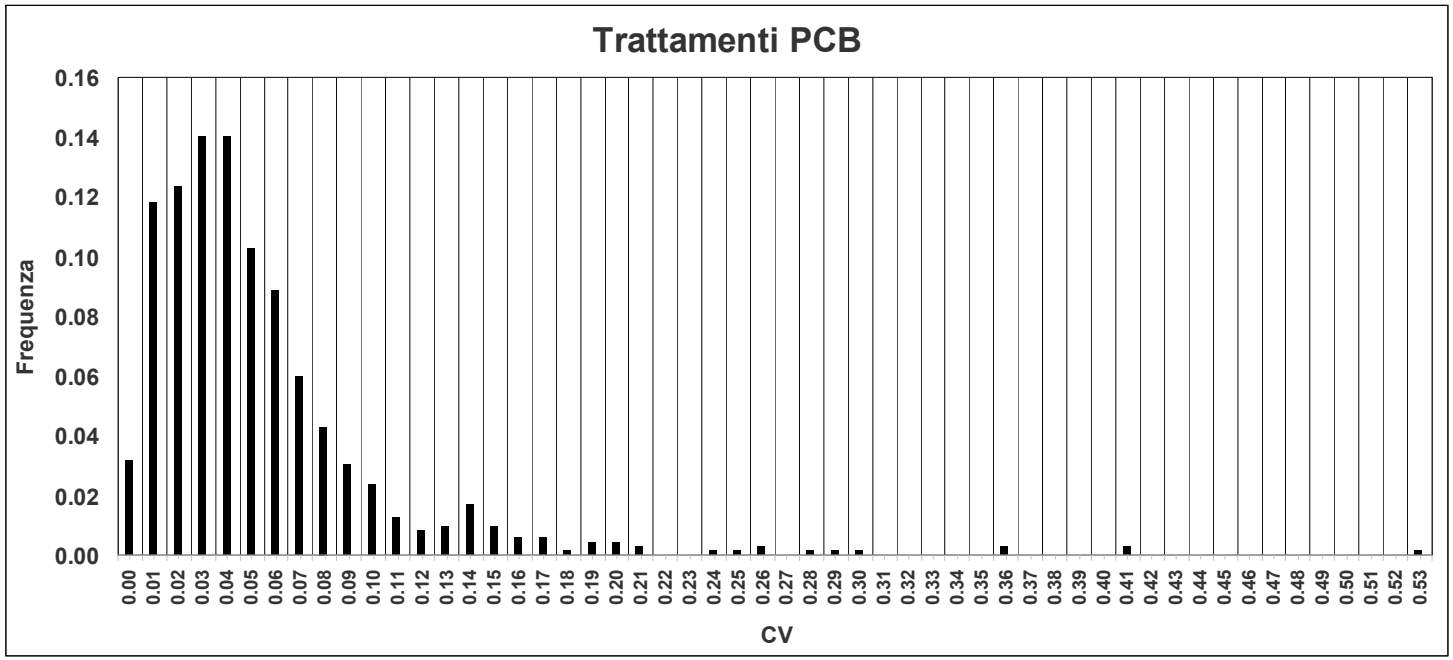
L’analisi è stata fatta valutando tutte le terne delle repliche dei campioni di suolo, per tutti i congeneri presenti per le seguenti classi di sostanze (PCB, PCDDs, PCDFs)

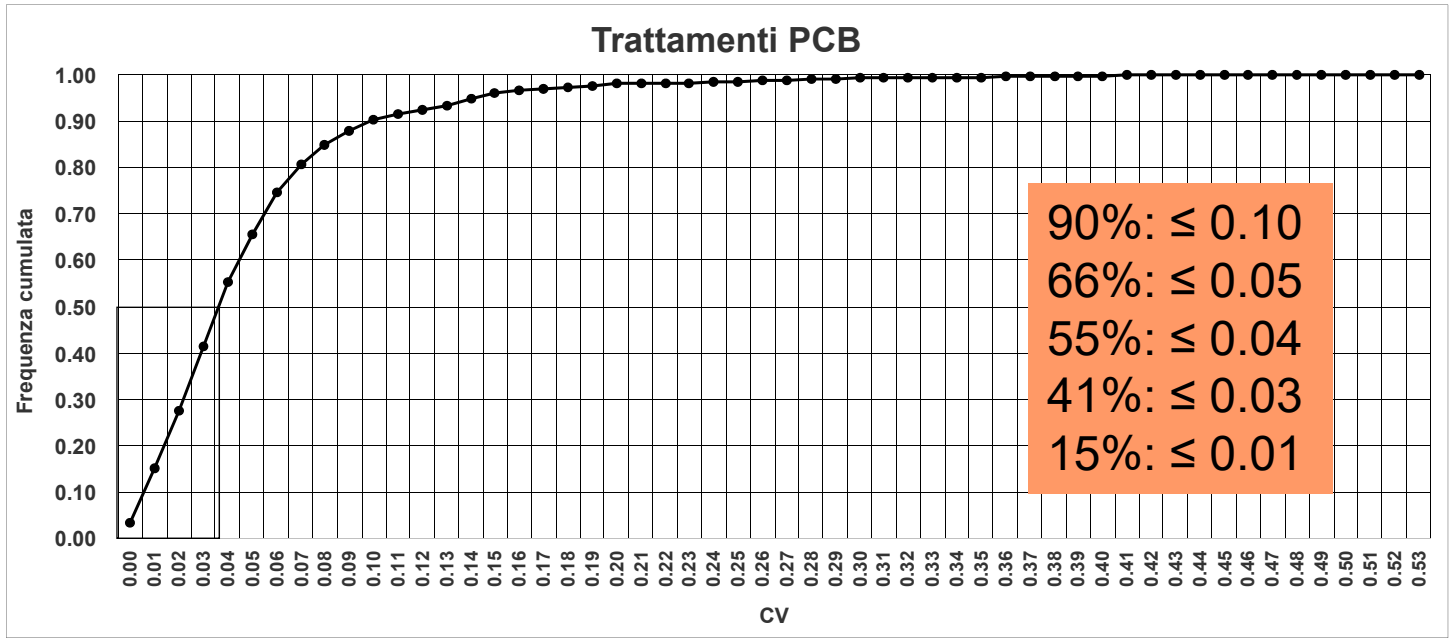
Sono stati analizzati i coefficienti di variazione percentuale in campioni di suolo t0 et2

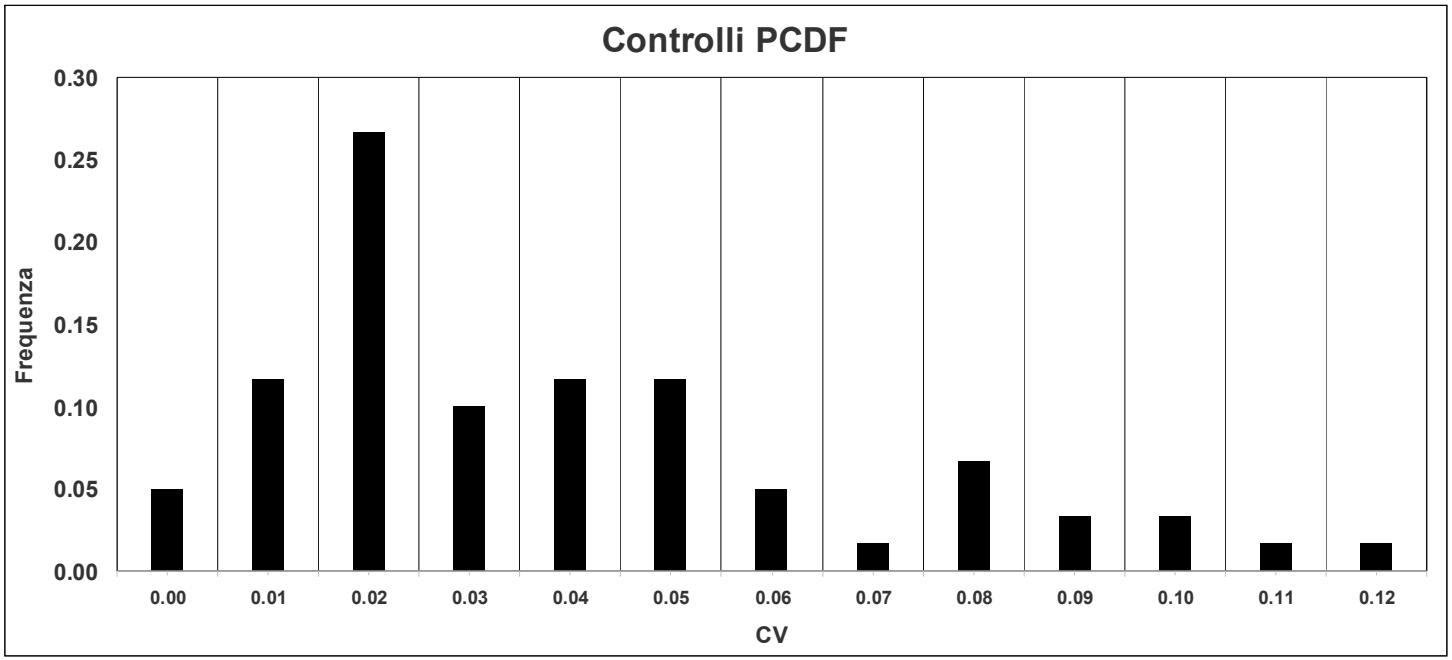
I dati sono presentati come istogrammi e come curve cumulate che riportano le frequenze (= le percentuali) dei punti sotto una determinata soglia, determinabile a piacere

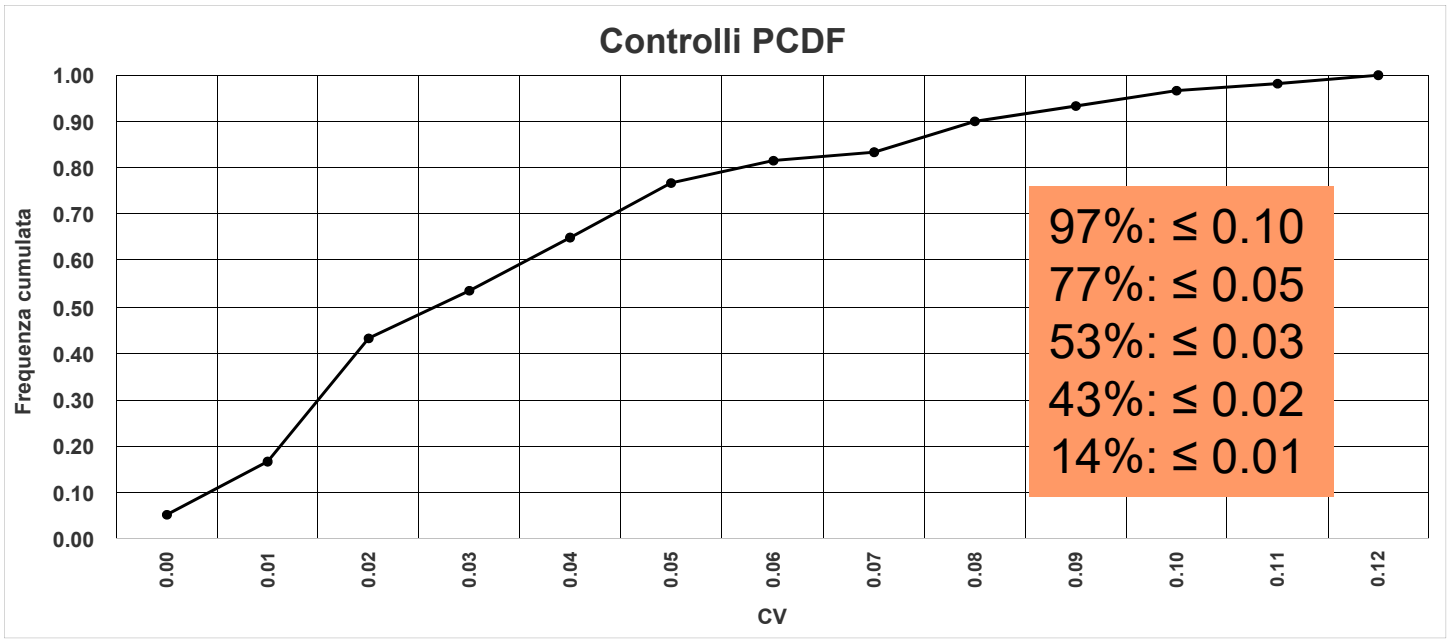

Controlli PCB
Frequenza
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52 0.53 0.54
CV

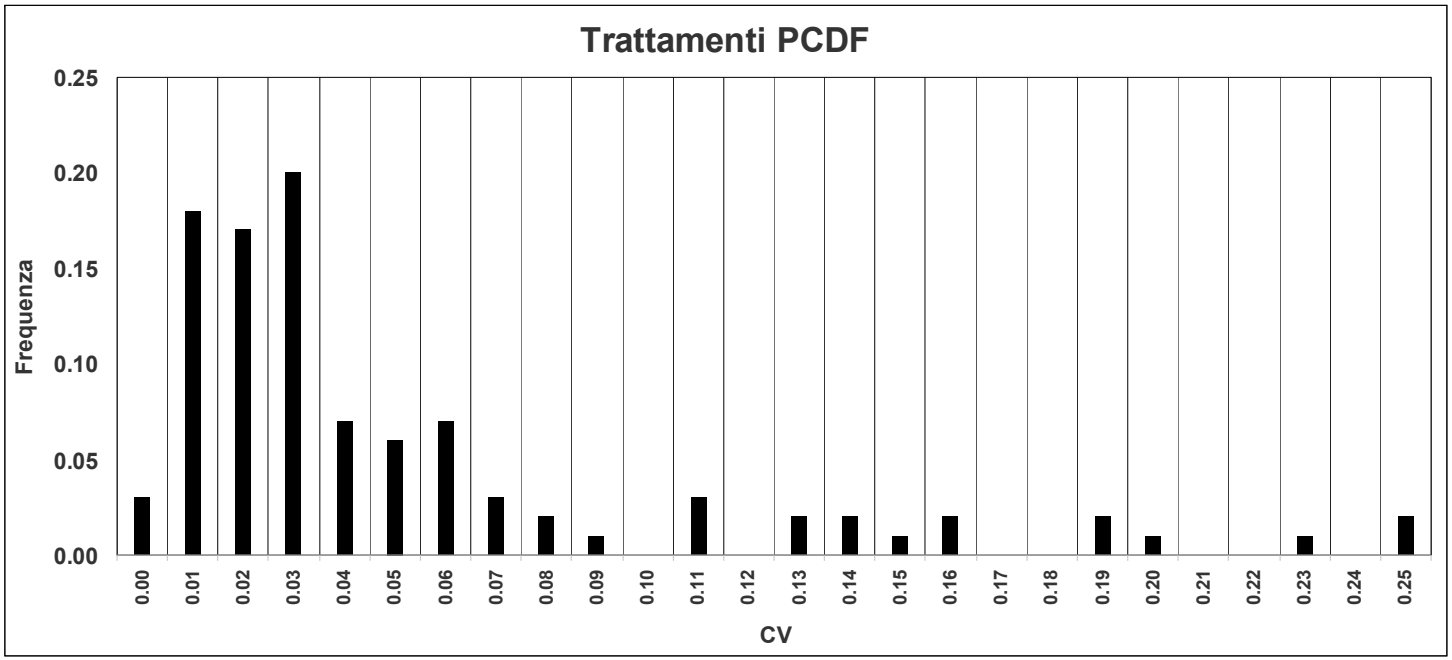

Controlli PCB
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52 0.53 0.54
CV
88%: ≤ 0.10
62%: ≤ 0.05
53%: ≤ 0.04
41%: ≤ 0.03
13%: ≤ 0.01

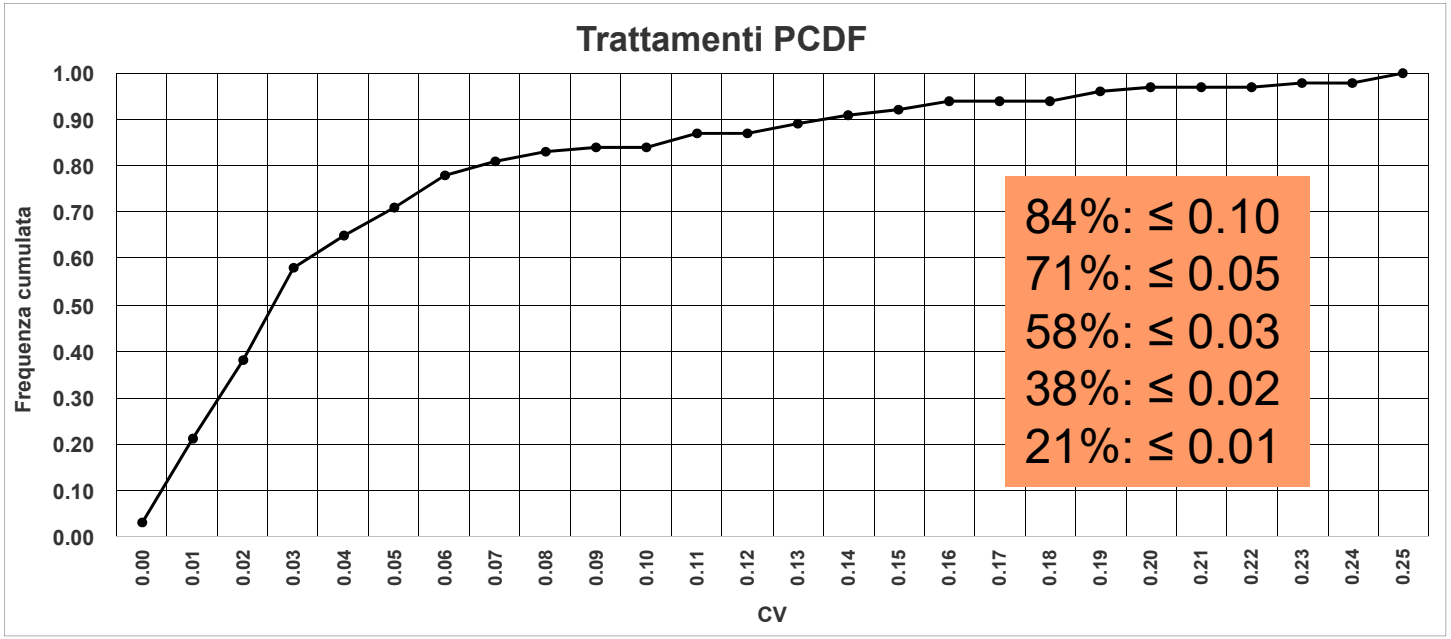

Trattamenti PCB
Frequenza
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52 0.53
CV

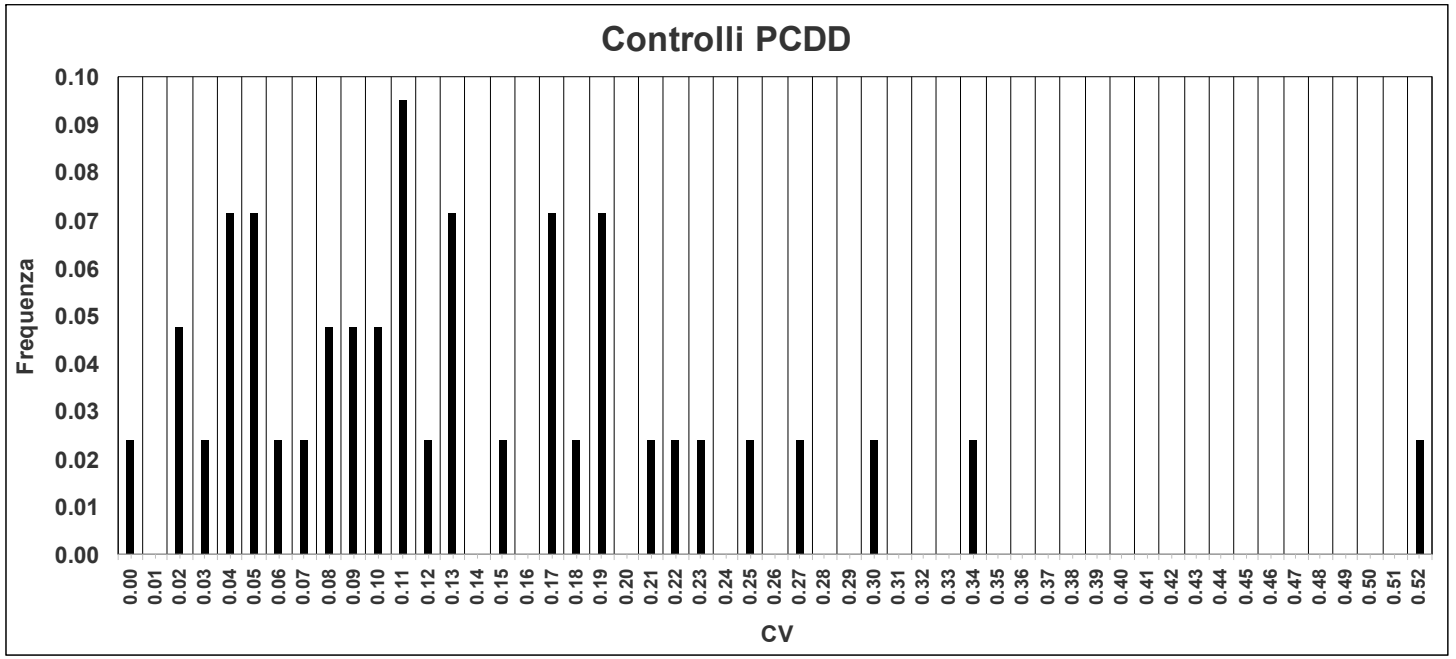

Trattamenti PCB
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52 0.53
CV
90%: ≤ 0.10
66%: ≤ 0.05
55%: ≤ 0.04
41%: ≤ 0.03
15%: ≤ 0.01

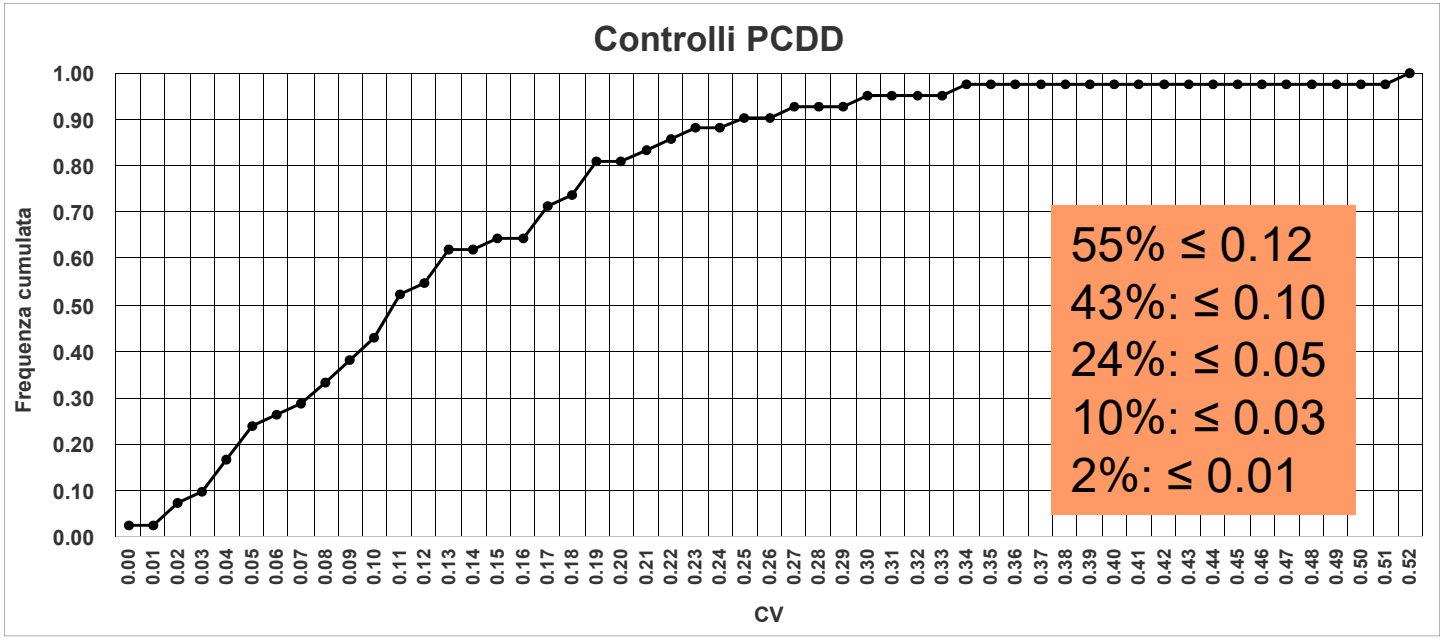

Controlli PCDF
Frequenza
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
0.08
0.09
0.10
0.11
0.12
CV

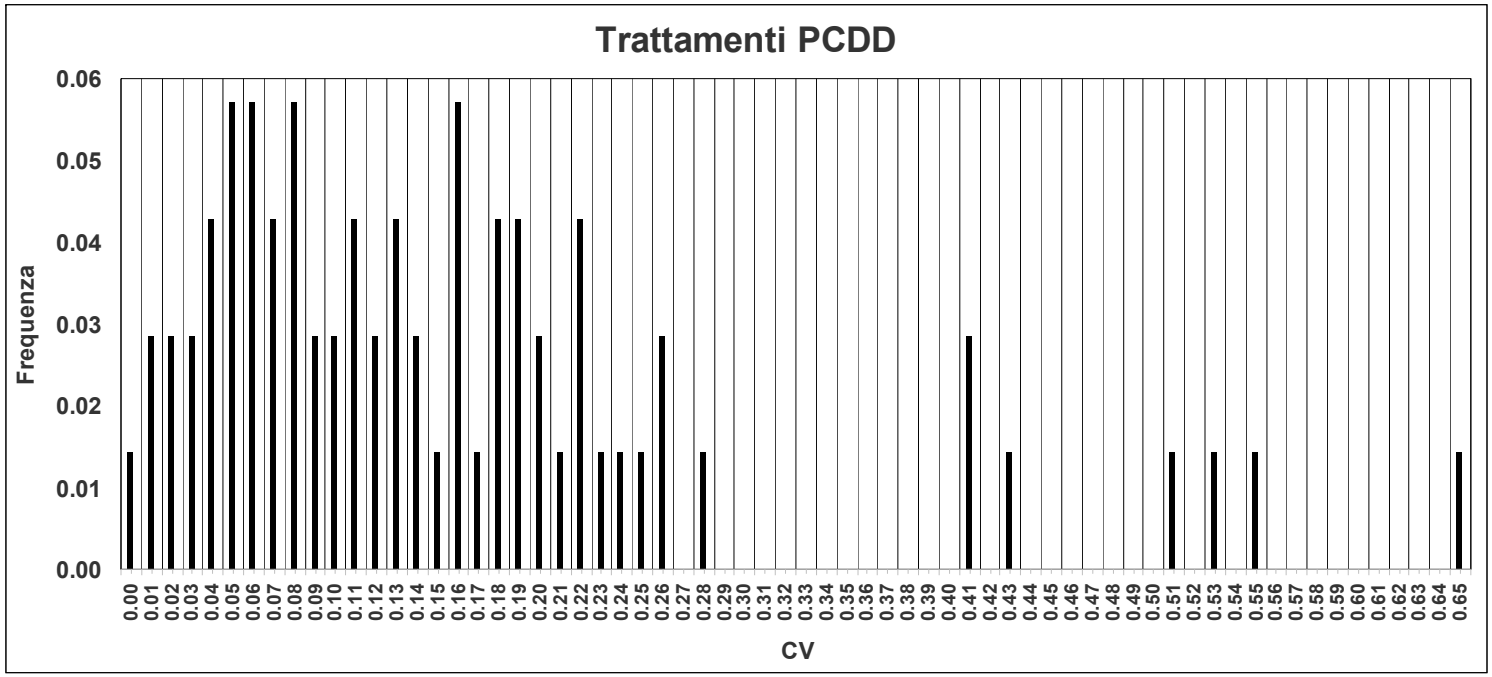

Controlli PCDF
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
0.08
0.09
0.10
0.11
0.12
CV
97%: ≤ 0.10
77%: ≤ 0.05
53%: ≤ 0.03
43%: ≤ 0.02
14%: ≤ 0.01

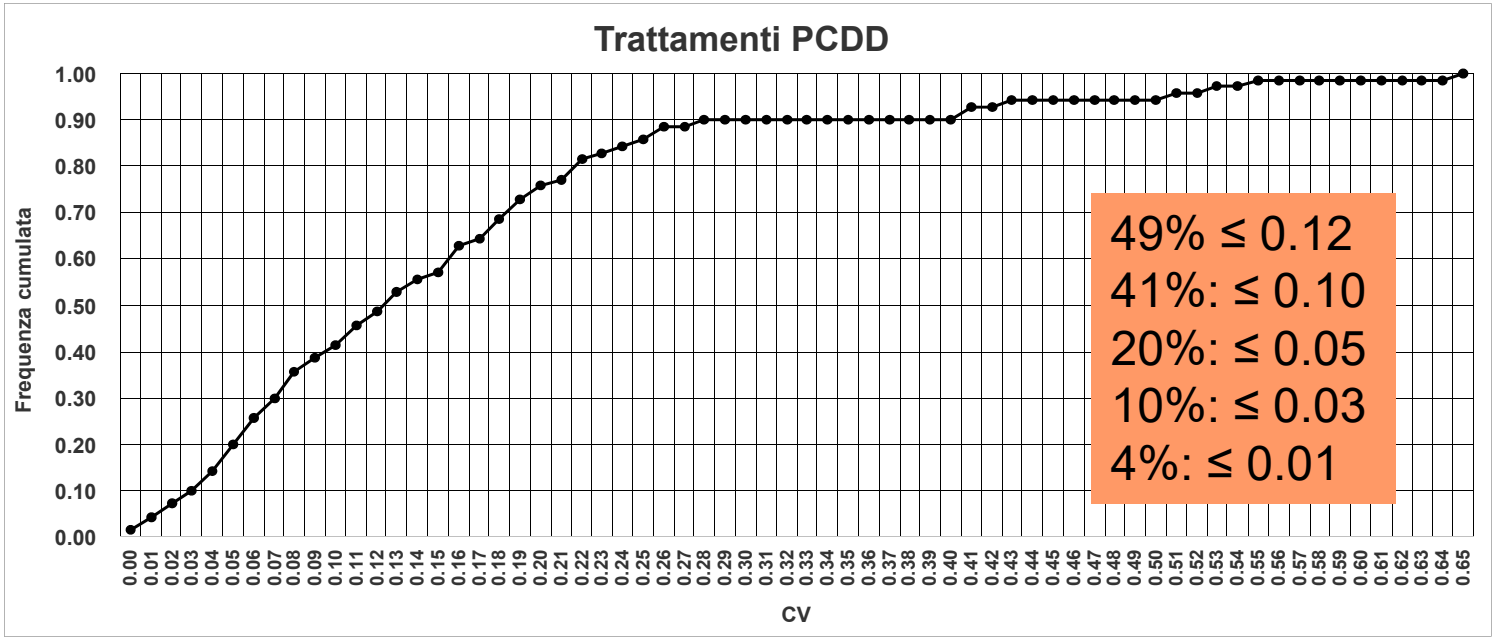

Trattamenti PCDF
Frequenza
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25
CV


Trattamenti PCDF
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25
CV
84%: ≤ 0.10
71%: ≤ 0.05
58%: ≤ 0.03
38%: ≤ 0.02
21%: ≤ 0.01


Controlli PCDD
Frequenza
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52
CV


Controlli PCDD
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52
CV
55% ≤ 0.12
43%: ≤ 0.10
24%: ≤ 0.05
10%: ≤ 0.03
2%: ≤ 0.01


Trattamenti PCDD
Frequenza
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52 0.53 0.54 0.55 0.56 0.57 0.58 0.59 0.60 0.61 0.62 0.63 0.64 0.65
CV


Trattamenti PCDD
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.10 0.11 0.12 0.13 0.14 0.15 0.16 0.17 0.18 0.19 0.20 0.21 0.22 0.23 0.24 0.25 0.26 0.27 0.28 0.29 0.30 0.31 0.32 0.33 0.34 0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.40 0.41 0.42 0.43 0.44 0.45 0.46 0.47 0.48 0.49 0.50 0.51 0.52 0.53 0.54 0.55 0.56 0.57 0.58 0.59 0.60 0.61 0.62 0.63 0.64 0.65
CV
49% ≤ 0.12
41%: ≤ 0.10
20%: ≤ 0.05
10%: ≤ 0.03
4%: ≤ 0.01

Considerando che la variabilità strumentale, ovvero analitica, appare generalmente compresa tra il 5 ed il 10% e che questa variabilità è legata alla **misura di standard di PCB, PCDD/Fs in solvente** e rappresenta le condizioni ideali, **minime**, del CV.

Quando intervengono attività di preparazione, estrazione e purificazione ambientale di un campione (anche in presenza di tecniche come la Japanese Slab Cake), la **variabilita può solo crescere.** In presenza anche di **ripetizioni indipendenti** (i singoli vasi di ogni trattamento) **occorre considerare una variabilità aggiuntiva**: quella **biologica** (sviluppo di pianta, suo apparato radicale, flora batterica in rizosfera) e quella legata alle **operazioni «colturali»** (irrigazione, misura potenziale redox, umidita).

Ovvero il valore di CV % **deve essere necessariamente maggiore del 5-10%**

Appare improbabile che numeri cosi importanti (ad es. il 66-71% dei campioni) **possano avere variabilità cosi bassa** e **testimoniano di anomalie evidenti**

Pertanto questi dati non possono essere considerati accettabili per la valutazione del potenziale di rhizoremediation.

ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

NOTA TECNICA

Oggetto: consulenza tecnica sulle criticità riscontrate nella valutazione della qualità di dati analitici di campioni di suoli e biomasse vegetali prodotti nella sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro.

La realizzazione dell'attività di sperimentazione per la bonifica del sito contaminato SIN BRESCIA-CAFFARO è stata condotta da ERSAF (Ente Regionale per i servizi all'agricoltura e alle foreste) in collaborazione con i consulenti: Prof. Di Guardo dell'Università dell'Insubria, la Prof.ssa Sara Bodin dell'Università degli Studi di Milano e il Prof. Randa dell'Università "La Sapienza" di Roma e dai loro collaboratori. Tale sperimentazione ha visto la crescita in vaso di alcune specie vegetali, sottoposte a differenti condizioni, su un substrato costituito da terreno contaminato prelevato nelle aree agricole del SIN e coltivato in serra. Le 10 tesi sperimentali e i relativi 7 controlli, ciascuno replicato 3 volte, hanno prodotto campioni di terreno e di biomassa vegetale da sottoporre ad analisi chimiche, appaltate da ERSAF a INDAM Laboratori S.r.l. di Castel Mella (BS), laboratorio accreditato come laboratorio di prova per i parametri e nelle matrici richiesti dalla sperimentazione.
I risultati prodotti nel marzo 2016 da INDAM Laboratori S.r.l, per un totale di 74 campioni, sono stati contestati dai consulenti scientifici di ERSAF che hanno espresso riserve sull'attendibilità dei dati analitici prodotti, riguardo in particolare, ai bassi coefficienti di variabilità dei valori delle tre repliche di campioni della stessa tesi sperimentale.
Tali riserve sono state discusse in un incontro avvenuto il 15 novembre 2016 a Roma presso la sede Ispra con la dott.ssa Stefania Balzamo e altri colleghi dell'ex Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA come si evince dal resoconto della giornata inserito in Allegato 1.
Durante l'incontro i tecnici di ISPRA hanno concordato sul fatto che i dati presentano una variabilità anomala, inferiore a quella di norma riscontrata nella pratica e nella letteratura analitica internazionale, e consigliato di chiedere a INDAM Laboratori S.r.l informazioni sul trattamento e sui processi analitici cui erano stati sottoposti i campioni, per valutarne la conformità. INDAM Laboratori S.r.l, ha inviato, tramite ERSAF, le informazioni richieste e la disponibilità a collaborare per approfondimenti tecnici presso il proprio laboratorio da parte di tecnici qualificati.
I dati prodotti da INDAM Laboratori S.r.l sono stati già valutati dai professori universitari sopracitati e di seguito vengono riportati i risultati e le conclusioni del documento "Relazione tecnico scientifica-Problematiche riscontrate nel processo di valutazione dei dati di analisi del suolo, forniti da INDAM Laboratori srl, ottenuti nell'ambito delle sperimentazioni in serra di tecniche di biorimedio" del 12/1/2017 redatto dal Prof. A. Di Guardo, dalla Prof.ssa S. Bodin e dalla Prof.ssa E. Zanardini (quest'ultima dell'Università dell'Insubria e collaboratrice del prof. A. Di Guardo).
Si riporta di seguito uno stralcio dell'Allegato 6 dal titolo "Analisi dei coefficienti di variazione nei campioni di suolo dei tempi T0 e T2" della relazione sopracitata in cui sono elencate le considerazioni sulle problematiche riscontrate sui risultati prodotti da INDAM Laboratori S.r.l.

Dove è (0.1%

I problemi riscontrati dalla valutazione dei risultati sono i seguenti:

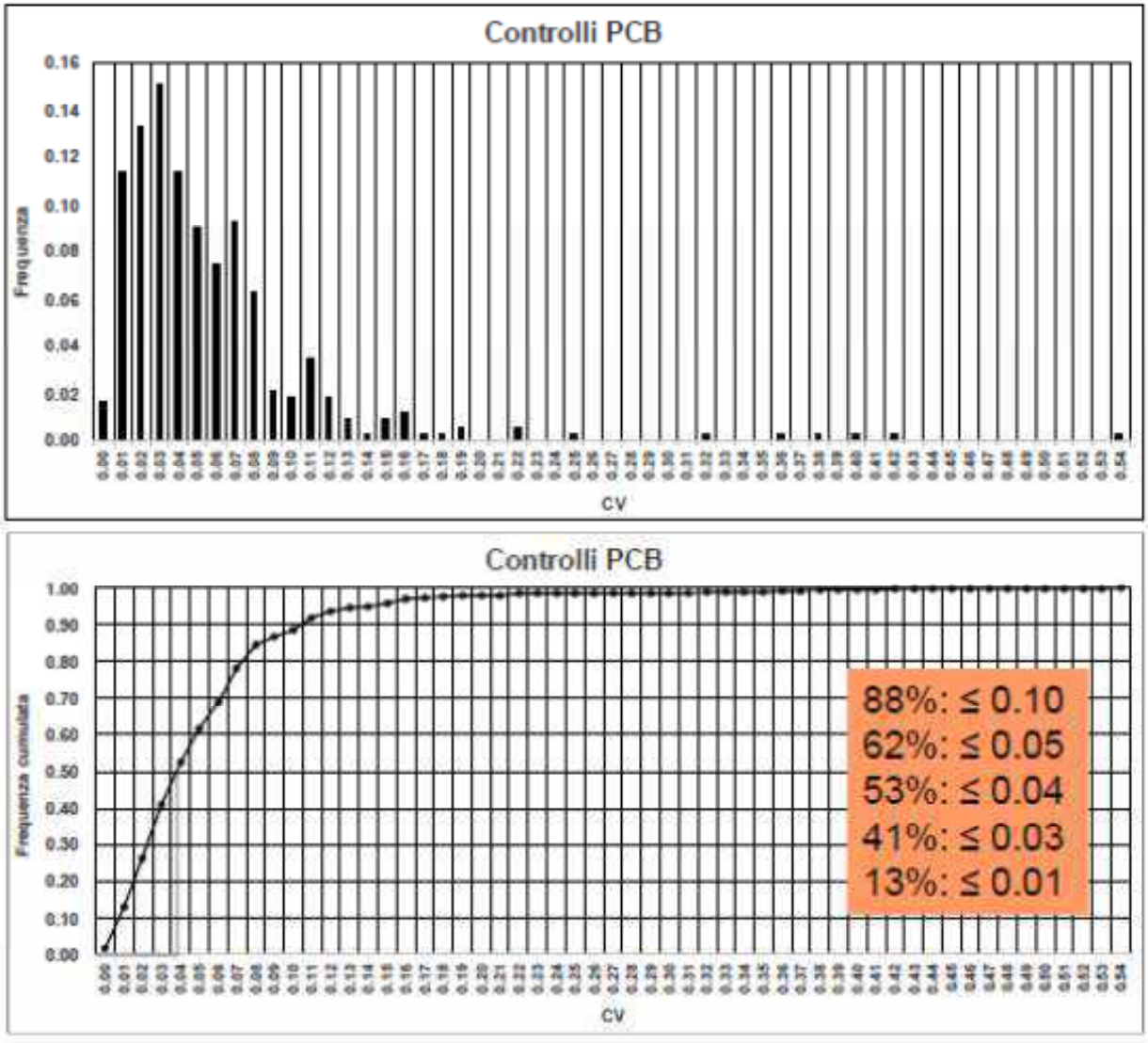
- Per PCB, bassissima variabilità tra le repliche dei controlli (CV% 1-4%, ad eccezione di C6 dove è ~50%); le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità simile a quella dei controlli (CV%: 1-6%) o addirittura più bassa: T1 e T10 con CV% dello 0.04% e 0.4% rispettivamente. Il valore dei PCB totali per il campione spia differiva dell'11% rispetto alla replica da cui derivava, mentre i totali delle tre repliche "in chiaro" differivano fra loro dello 0.2-2.5%.
- Per PCDF, ancora bassa variabilità tra le repliche dei controlli (CV%: 0.3-10%), ad eccezione solo di C6 dove è ~130%; le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità simile a quella dei controlli (CV%: 2-8%). Per PCDF, il campione spia ha una concentrazione che differisce del 6% rispetto a quella della replica da cui deriva e mentre le tre repliche della stessa tesi differiscono fra loro dello 1-5%.
- Per PCDD vi è invece elevata variabilità tra le repliche dei controlli (CV%: fino a 43%); solo in alcuni casi C1_t2, C2_t2, C4_t2, C5_t1, C7_t1 e C7_t2 la variabilità è bassa (CV% 3- 13%); le repliche dei trattamenti mostrano una variabilità molto più bassa (CV%: 1-27%). Per PCDD, il campione spia ha una concentrazione che differisce dell'24% rispetto a quella della replica corrispondente, mentre le tre repliche della stessa tesi differiscono fra loro dello 6-18%.
- Per As e Hg, bassa variabilità tra le repliche dei controlli (CV%: 0.2-5%) ad eccezione solo di C6 per Hg dove è ~15% e C4 al t2 dove è ~18%); le repliche dei trattamenti mostrano un range di variabilità più grande di quello dei controlli (CV%: 1-16%), fatta eccezione per P10

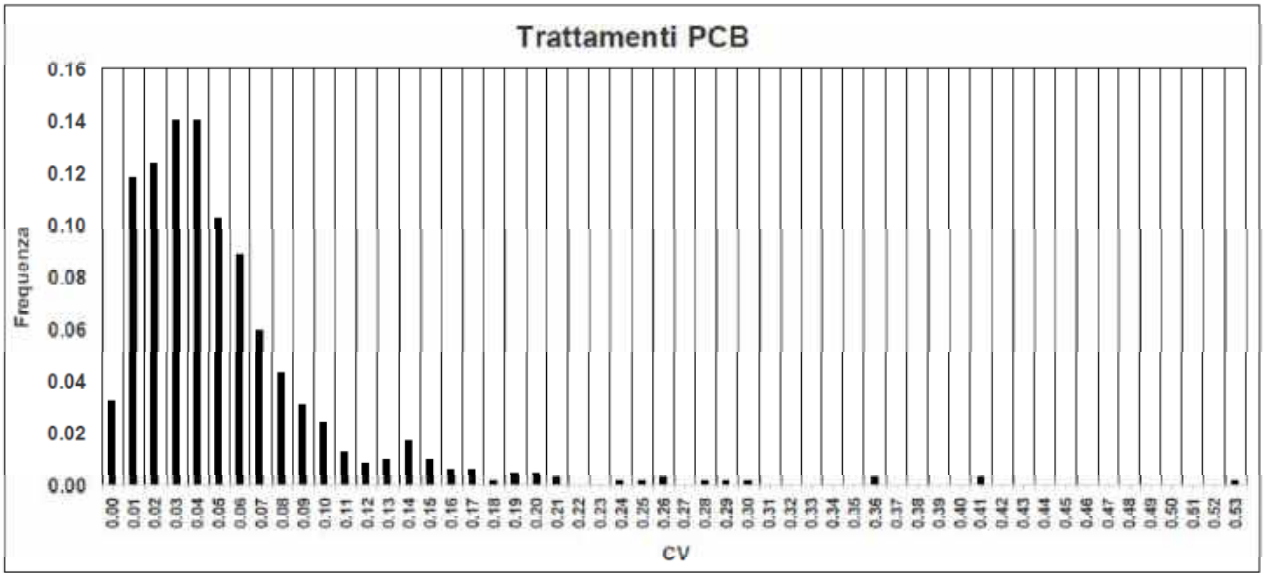
dove CV%: 0.1%. Per As e Hg, i risultati del campione spia mostra valori praticamente identici a quelli derivante dalla stessa replica.

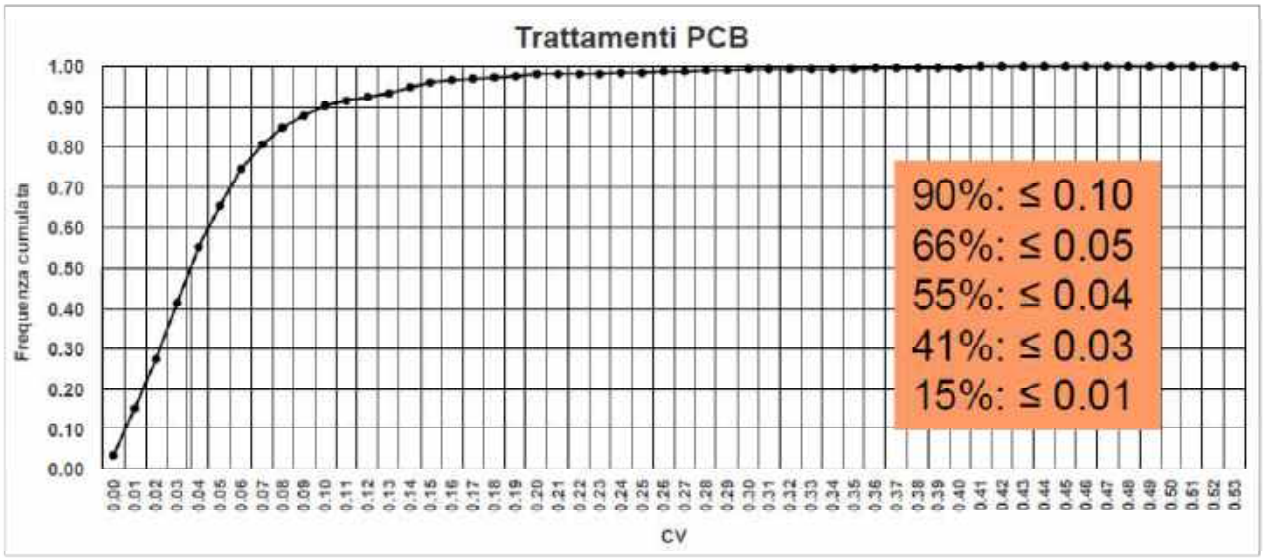
"

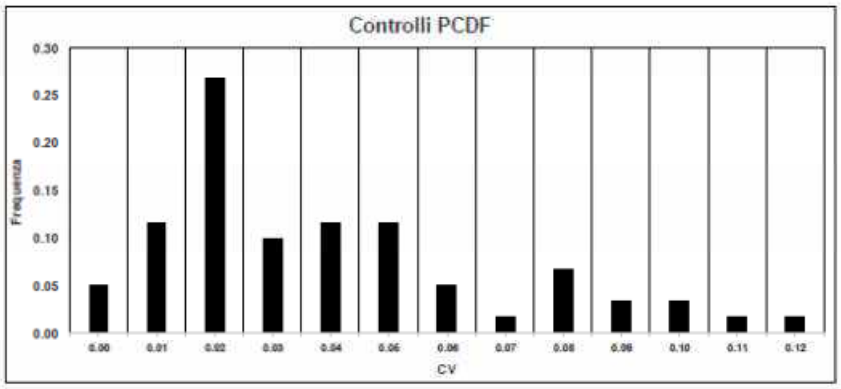
Si riportano inoltre i grafici con le frequenze cumulative dei coefficienti di variazione dei vari parametri sia nei controlli che nei trattamenti.

Figura 1- Valutazione delle frequenze dei coefficienti di variazione per PCB e PCDD/PCDF nei campioni di controllo e nei campioni trattati

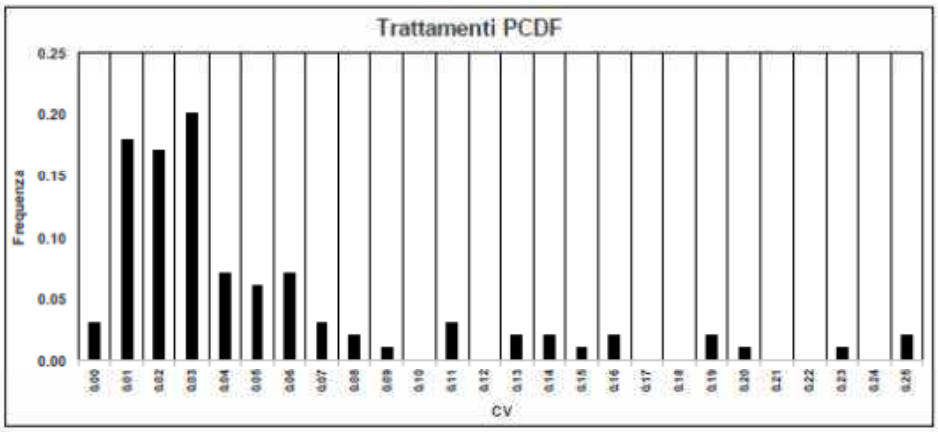


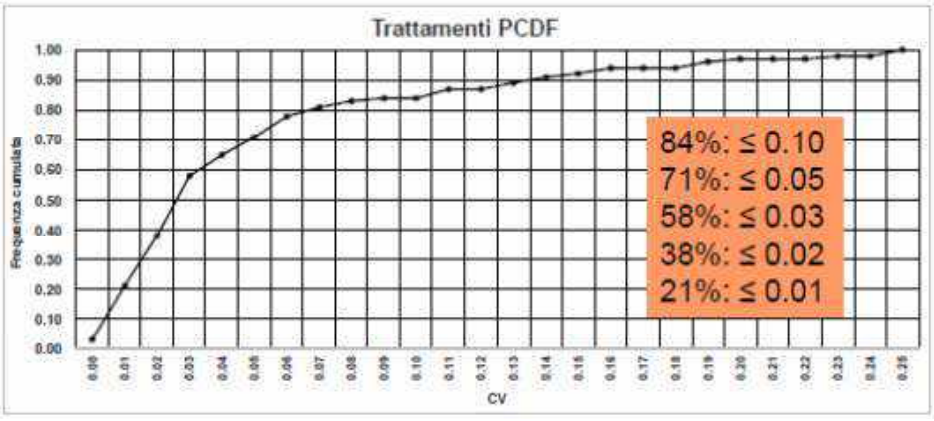

Trattamenti PCB
Frequenza
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
CV

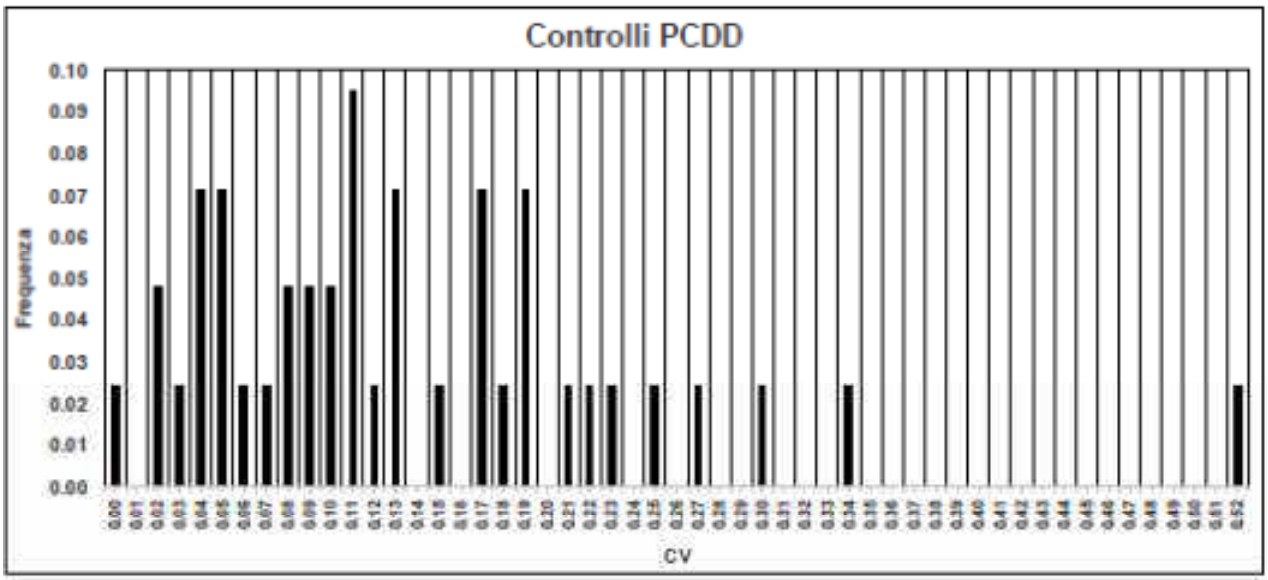

Trattamenti PCB
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
CV
90%: ≤ 0.10
66%: ≤ 0.05
55%: ≤ 0.04
41%: ≤ 0.03
15%: ≤ 0.01

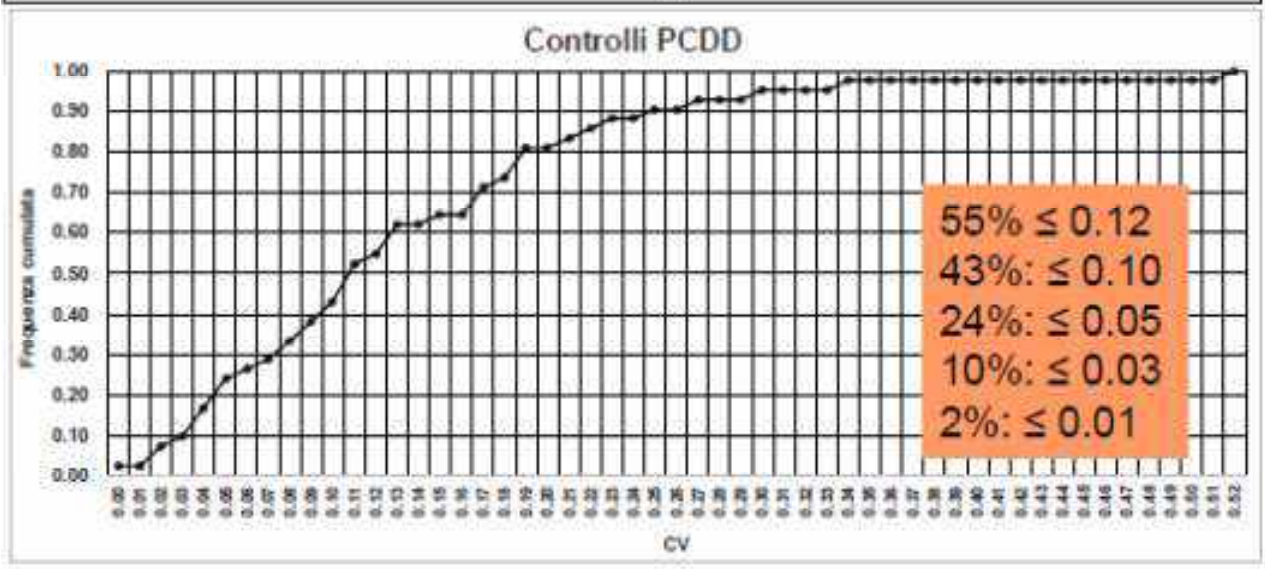

Controlli PCDF
Frequenza
CV

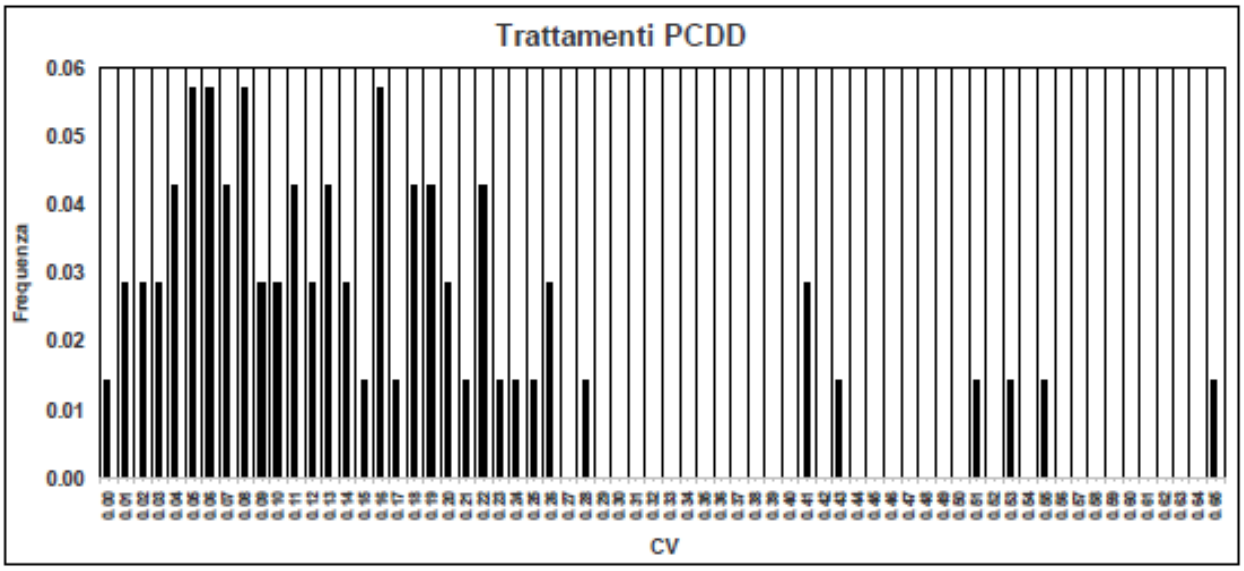

Controlli PCDF
Frequenza cumulata
CV
97%: ≤ 0.10
77%: ≤ 0.05
53%: ≤ 0.03
43%: ≤ 0.02
14%: ≤ 0.01

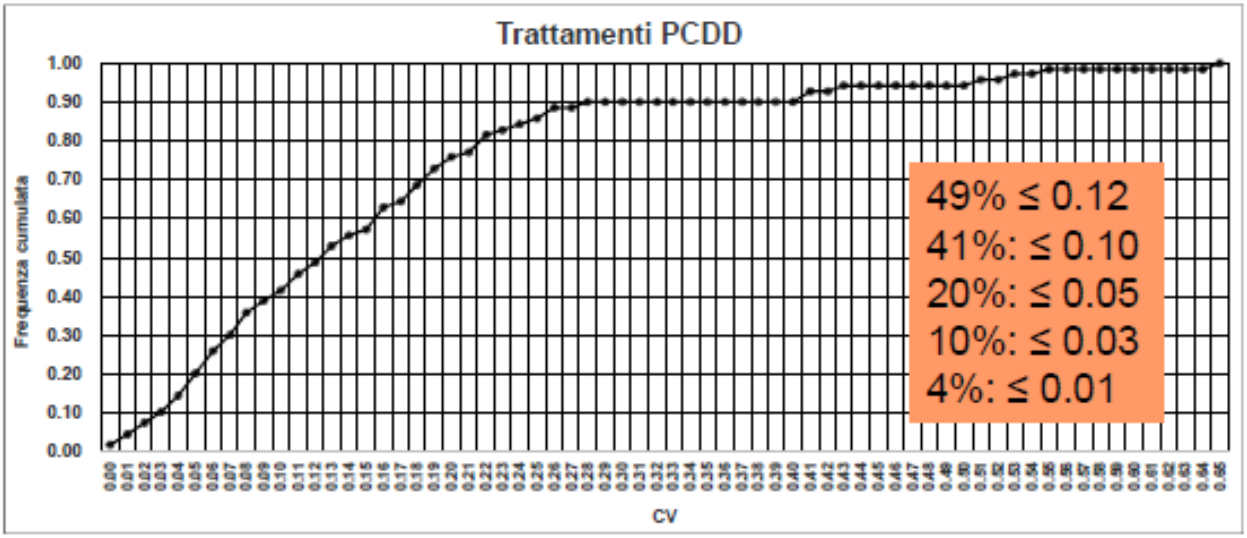

Trattamenti PCDF
Frequenza
CV


Trattamenti PCDF
Frequenza cumulata
CV
84%: ≤ 0.10
71%: ≤ 0.05
58%: ≤ 0.03
38%: ≤ 0.02
21%: ≤ 0.01


Controlli PCDD
Frequenza
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
CV


Controlli PCDD
Frequenza cumulata
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
55% ≤ 0.12
43%: ≤ 0.10
24%: ≤ 0.05
10%: ≤ 0.03
2%: ≤ 0.01
CV





Per verificare l'attendibilità dei dati prodotti da INDAM Laboratori srl sono stati analizzati i documenti richiesti da ISPRA e forniti dal suddetto laboratorio, tramite ERSAF, con le e-mail del 9 marzo 2017 e del 23 marzo 2017. La documentazione inviata a ISPRA per la validazione della qualità dei dati analitici di campioni di suoli e biomasse vegetali prodotti nella sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro, è elencata in Allegato 2.

ISPRA, dopo aver visionato tutta la documentazione elencata in Allegato 2, ha analizzato approfonditamente i dati presenti nei seguenti documenti:

- Partecipazione del laboratorio INDAM a circuiti interlaboratorio
- 3 analisi condotte su due Materiali di Riferimento (NIST SRM 1944 e UNICHIM SU-1-2-15) durante la campagna analitica sulla sperimentazione in oggetto. I certificati dei 2 materiali di riferimento sono stati allegati alla documentazione inviata ad ISPRA.
- Risultati analitici della campagna sperimentale sulle tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro (campioni al tempo T0 e al tempo T2)
- "Relazione tecnica sull'analisi dei microinquinanti organici e inorganici relativa al progetto Sperimentazione di tecniche di biorimedio SIN Brascia Caffaro" del 13/01/2016 e redatta su carta intestata INDAM Laboratori srl.

Come si evince dalla suddetta Relazione tecnica i campioni sono stati sottoposti da INDAM ad una preparazione del campione secondo il metodo JLC (Japanese slab cake) producendo 1 campione di prova per

la determinazione di PCDD/PCDF e PCB (a cui fa riferimento la seguente trattazione dei dati) e altri 4 per le determinazioni di Pesticidi, metalli e carbonio organico, residuo secco e una per eventuali analisi di controllo (quando fossero risultate necessarie). I bianchi sono stati effettuati su terre di diatomee. 10 g di campione estratti e poi purificati sono stati tutti analizzati mediante HRGC/HRMS.
Il metodo utilizzato da INDAM per la determinazione di PCDD/PCDF in fanghi organici e inorganici, terreni, sedimenti e scorie (rifiuti) fa riferimento al metodo EPA 1613 B (1994) ed è stato validato dal laboratorio riportando i risultati sui documenti RGP107A MTH 332 rev.00 e rev.01. La strumentazione utilizzata è la seguente: gascromatografo con spettrometro di massa ad alta risoluzione HRGC/HRMS (SC/281/01-08) Thermo Scientific TRACE GC ULTRA accoppiato allo spettrometro di massa Thermo Scientific DFS, estrattore Soxhelet con riscaldatore per palloni, evaporatore rotante, bilancia analitica (sensibilità 0,1 mg) sistema di purificazione FMS Power Prep (SC/163/01) turbovap (SC/246/01). I parametri per la validazione del metodo sono stati: sensibilità previste per standard CS1 (S/N >10), linearità della risposta (CV% del fattore di risposta < 20%), range di accettabilità IPR per media e dev standard, stima dell'incertezza di misura tramite gli esiti del circuito interlaboratorio CIND 2009- 2010.
Il metodo per la determinazione di PCB fa riferimento al metodo EPA 1668 C (2010) ed è stato validato dal laboratorio riportando i risultati sui documenti RGP107A MTH 410 rev.0. Lo strumento utilizzato per la determinazione dei PCB è il gascromatografo Thermo Scientific TRACE GC ULTRA accoppiato allo spettrometro di massa Thermo Scientific DFS.

Nel 2016 INDAM, durante le analisi della sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro, ha partecipato solo a Circuiti interlaboratorio per metalli e IPA in fanghi e terreni utilizzando ICP-MS e GC/MS a bassa risoluzione.

Durante la campagna di analisi sono stati analizzati anche due Materiali di Riferimento Certificati (CRM):

- NIST SRM 1944 per PCDD/PCDF
- UNICHIM SU-1-2-15 per PCB

Di seguito sono riportate le tabelle con il calcolo del coefficiente di variazione percentuale (CV%) per le tre repliche indipendenti effettuate sui due CRM. E' stato quindi calcolato l'indice di compatibilità En rispetto al CRM secondo la norma ISO 13528:2015 "Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison". L'indice viene calcolato con l'equazione mostrata di seguito:

$$En = \frac{X_{LAB} - X_{RM}}{\sqrt{U(X_{LAB})^2 + U(X_{RM})^2}}$$

dove:
X_{LAB} = risultato ottenuto dal laboratorio nell'analisi del Materiale di riferimento
X_{RM} = valore assegnato presente nel certificato del materiale di riferimento
$U(X_{LAB})$ = incertezza estesa del laboratorio nell'analisi del Materiale di riferimento
$U(X_{RM})$ = incertezza estesa del valore assegnato presente nel certificato del materiale di riferimento

Tale indice deve essere comunque utilizzato con prudenza poiché è definito come rapporto tra due misure di prestazione separate, ma tra esse correlate. La validità dell'indice dipende quindi se l'incertezza è stata calcolata in modo appropriato. Tale valore può variare tra -1 e 1 ed indica una corretta misura del parametro e una corretta stima dell'incertezza.
Al di fuori di questo intervallo lo scostamento del risultato della misura prodotta dal laboratorio rispetto al valore assegnato del CRM indica che la misura o la stima dell'incertezza non sono valide.

Di seguito è riportata l'elaborazione dell'indice En sulle prove condotte da INDAM sui Materiali di Riferimento Certificati. Tale elaborazione è stata condotta utilizzando l'incertezza stimata da INDAM per i risultati della sperimentazione in serra per le tecniche di biorimedio sui campioni di terreno prelevati dal SIN Brescia Caffaro in relazione all'incertezza dichiarata sul certificato del CRM utilizzato.

Tabella 1- Elaborazioni sui risultati ottenuti da INDAM sul materiale di riferimento certificato NIST SRM 1944 per PCDD/PCDF

Matrice certificata NIST SRM 1944											
data estrazione	01/12/2015	25/01/2016	06/02/2016								
data analisi	12/12/2015	28/01/2016	17/02/2016					VALORE DI RIFERIMENTO			
	prova 1 (ug/kg)	prova 2 (ug/kg)	prova 3 (ug/kg)	Media	Scarto tipo	CV%	incertezza	µ (ug/kg)	incertezza	En	
2,3,7,8 TCDD	0,135	0,142	0,131	0,136	0,005	3,937	0,054	0,133	0,009	0,102038248	
1,2,3,7,8 PeCDD	0,0283	0,0218	0,0223	0,024	0,004	14,877	0,010	0,019	0,002	1,03995886	
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,0325	0,0262	0,0241	0,028	0,004	15,733	0,011	0,026	0,003	0,280757164	
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,0763	0,0610	0,0547	0,064	0,011	17,339	0,026	0,056	0,006	0,608541484	
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,0616	0,0458	0,0427	0,050	0,010	20,272	0,020	0,053	0,007	-0,280331251	
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,930	0,847	0,867	0,882	0,043	4,905	0,353	0,80	0,07	0,454308555	
OCDD	5,82	5,66	5,67	5,717	0,094	1,641	2,287	5,8	0,7	-0,069645013	
2,3,7,8 TCDF	0,0389	0,0370	0,0400	0,039	0,002	3,922	0,015	0,039	0,015	-0,035313831	
1,2,3,7,8 PeCDF	0,0424	0,0495	0,0452	0,046	0,004	7,869	0,018	0,045	0,007	0,072411798	
2,3,4,7,8 PeCDF	0,0395	0,0458	0,0431	0,043	0,003	7,494	0,017	0,045	0,004	-0,249350549	
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,200	0,203	0,200	0,201	0,002	0,756	0,080	0,22	0,03	-0,444384395	
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,0910	0,0968	0,0930	0,094	0,003	3,151	0,037	0,09	0,01	0,185597518	
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,0647	0,0655	0,0612	0,064	0,002	3,530	0,026	0,054	0,006	0,746837251	
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,0157	0,0160	0,0148	0,016	0,001	4,150	0,006				
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	1,02	1,07	1,00	1,030	0,033	3,187	0,412	1,0	0,1	0,139300152	
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0,0439	0,0463	0,0446	0,045	0,001	2,757	0,018	0,040	0,006	0,517053723	
OCDF	1,06	0,98	1,19	1,075	0,106	9,873	0,430	1,0	0,1	0,338305888	

Per il materiale di riferimento certificato NIST SRM1944 il valore di En è sempre all'interno dell'intervallo richiesto dalla norma ISO 13528:2015 e quindi le analisi condotte su questo materiale dal laboratorio possono ritenersi valide.

Le incertezze dei valori di riferimento dei PCB sulla Matrice UNICHIM SU-1-2-15 (utilizzata da INDAM come CRM) non sono riportate poiché nella documentazione fornita da UNICHIM, vengono riportati solo i valori di CV% derivanti da circuiti interlaboratorio; conseguentemente il Materiale di Riferimento non è corredato dalla valutazione dell'incertezza. In questo caso si è proceduto al calcolo dell'indice di compatibilità En solo con l'uso dello scarto tipo ricavato dal dato del CV%.

Tabella 2- Elaborazioni sui risultati ottenuti da INDAM sul materiale di riferimento certificato UNICHIM SU-1-2-15 per i PCB

Matrice UNICHIM SU-1-2-15												
data estrazione	03/02/2016	06/02/2016	10/02/2016									
data analisi	24/02/2016	29/02/2016	29/02/2016					VALORE DI RIFERIMENTO				
Parametro	prova 1 (ng/kg)	prova 2 (ng/kg)	prova 3 (ng/kg)	Media	scarto tipo	CV	CV%	µ (ng/kg)	scarto tipo	CV	CV%	En con scarto tipo
PCB 81	176	191	185	184	7	0,04	4	156	39,312	0,252	25,2	1,3
PCB 77	4335	4624	4603	4521	161	0,04	4	4245	1044,27	0,246	24,6	0,5
PCB 123	2188	2287	2280	2251	55	0,02	2	2022	483,258	0,239	23,9	0,9
PCB 118	109700	121448	115284	115477	5876	0,05	5	99266	20150,998	0,203	20,3	1,4
PCB 114	3534	3587	3503	3541	43	0,01	1	2438	524,17	0,215	21,5	4,2
PCB 105	55663	57556	55241	56153	1233	0,02	2	47702	8204,744	0,172	17,2	2,0
PCB 126	913	940	880	911	30	0,03	3	778	128,37	0,165	16,5	1,9
PCB 167	8948	9601	9084	9211	345	0,04	4	8820	1023,12	0,116	11,6	0,6
PCB 156	16409	21734	19920	19354	2707	0,14	14	18552	3135,288	0,169	16,9	0,3
PCB 157	4816	5291	4752	4953	295	0,06	6	4628	874,692	0,189	18,9	0,6
PCB 169	83	115	109	102	17	0,17	17					
PCB 189	4252	4699	4459	4470	224	0,05	5	4192	779,712	0,186	18,6	0,6
PCB 1	509	563	591	554	42	0,08	8					
PCB 3	515	538	540	531	14	0,03	3					
PCB 4	1557	1751	1759	1689	114	0,07	7					
PCB 15												
PCB 19	1064	1161	1176	1133	61	0,05	5					
PCB 37	7311	8268	8416	7998	600	0,07	7					
PCB 54	69	68	77	71	5	0,07	7					
PCB 104												
PCB 155												
PCB 188												
PCB 202	12341	12865	12416	12541	283	0,02	2					
PCB 205	4584	5154	4728	4822	296	0,06	6					
PCB 208	8705	9198	8544	8815	341	0,04	4					
PCB 206	34218	42842	33074	36711	5340	0,15	15					
PCB 209	1451345	1633110	1780138	1621531	164702	0,10	10					
PCB 28	31041	33928	35654	33541	2331	0,07	7	22820	3582,74	0,157	15,7	3,6
PCB 52	55223	57758	55672	56217	1352	0,02	2	54997	8854,517	0,161	16,1	0,3
PCB 95	47951	52339	51994	50761	2440	0,05	5	43557	7535,361	0,173	17,3	1,6
PCB 99	35383	37777	37523	36894	1315	0,04	4	31069	5623,489	0,181	18,1	1,9
PCB 101 + 90	90275	97803	96785	94954	4084	0,04	4	81677				3,3
PCB 110	74133	80406	79046	77861	3300	0,04	4	72091	12471,743	0,173	17,3	0,8
PCB 128	29933	33409	31537	31626	1739	0,05	5	20324	2642,12	0,13	13,0	5,2
PCB 138	164542	179709	168973	171075	7799	0,05	5	147058	29411,6	0,2	20,0	1,4
PCB 146	29232	30589	29378	29733	744	0,03	3	23044	4401,404	0,191	19,1	2,9
PCB 149	141672	146110	139889	142557	3204	0,02	2	99500	17213,5	0,173	17,3	4,7
PCB 151	51227	50463	49392	50361	922	0,02	2	35955	7838,19	0,218	21,8	3,6
PCB 153 + 168	287686	295040	289126	290617	3897	0,01	1	226145				
PCB 170	72710	77337	72470	74172	2744	0,04	4	80871	22805,622	0,282	28,2	-0,6
PCB 177	43047	43076	42290	42804	446	0,01	1	32700	7651,8	0,234	23,4	2,6
PCB 180	166341	181399	166574	171438	8627	0,05	5	156720	38866,56	0,248	24,8	0,7
PCB 183	19970	19461	19133	19521	421	0,02	2	15896	3513,016	0,221	22,1	2,0
PCB 187	154265	144240	143892	147466	5891	0,04	4	118242	26486,208	0,224	22,4	2,0

Per il materiale di riferimento certificato UNICHIM SU1-2-15 il valore di En è spesso superiore ad 1 e quindi i risultati dell'analisi condotta da INDAM su questo materiale sembrano meno attendibili. In questo caso bisogna comunque tener conto del fatto che il calcolo del coefficiente En è stato effettuato mettendo in relazione lo scarto tipo e non le incertezze come richiesto dalla norma tecnica sopracitata.
Inoltre, nella valutazione di questi risultati, si possono fare le seguenti considerazioni:

- Per PCDD/PCDF: CV%= 0,76-20,00% la variabilità nell'analisi del CRM è maggiore rispetto a quella generalmente riscontrata nei congeneri dei campioni. Infatti nelle analisi effettuate da INDAM si è evidenziato che il 55% delle repliche dei controlli e il 49% delle repliche dei trattamenti hanno un CV% compreso all'interno dell'intervallo 1-12%.
- Per PCB: CV%= 1-17% è la variabilità nell'analisi del CRM; mentre per le repliche di circa il 90% dei campioni (sia di controllo che trattati) hanno un CV% compreso all'interno dell'intervallo 1-10%. Anche in questo caso la variabilità nell'analisi del CRM è maggiore di quella riscontrata nei campioni.

Successivamente sono stati richiesti ad INDAM ulteriori documenti e più precisamente i rapporti di validazione dei metodi chimici utilizzati per l'analisi delle PCDD/PCDF e dei PCB. Non sono state richieste le informazioni circa la modalità di integrazione dei picchi poiché dai report di quantificazione prodotti dal software EXCALIBUR utilizzato dallo strumento Thermo Scientific TRACE GC ULTRA accoppiato allo spettrometro di massa Thermo Scientific DFS risulta che, per la maggior parte dei congeneri sia dei PCB che di PCDD/PCDF, l'integrazione è quella eseguita in automatico dal software (A automatica, M manuale).

Dall'analisi della documentazione sulla validazione dei due metodi si riscontra che la validazione è stata condotta secondo i requisiti richiesti della norma tecnica UNI CEI EN ISO IEC 17025.
Per la determinazione di PCDD/PCDF che fa riferimento al metodo EPA 1613 B (1994) risulta che la ripetibilità percentuale varia da un minimo di 9,0% ad un massimo del 13% a concentrazioni variabili da circa 9 ng/kg a circa 90 ng/kg. L'incertezza, calcolata rispetto ai Circuiti interlaboratorio a cui ha partecipato negli anni precedenti, varia rispetto al congenere ed è intorno a oltre il 50%.
Per la determinazione dei PCB, che fa riferimento al metodo EPA 1668 C (2010), risulta che la ripetibilità percentuale varia in un intervallo tra un minimo del 5,5% per il PCB99 ad un massimo del 14% per il PCB209; mentre l'incertezza estesa viene stimata tra il 29 e il 31%.

Considerazioni finali:
La valutazione della documentazione prodotta da INDAM ed elencata in Allegato 2, non permette di individuare quali siano le cause di una variabilità così bassa ottenuta sui risultati dei campioni sperimentali. Inoltre, poiché nella documentazione presentata non ci sono i risultati di prove valutative relative a PCDD/PCDF e PCB, non si può dare una valutazione sulla prestazione del laboratorio per l'anno 2016 su tali parametri. Infatti il laboratorio ha partecipato a prove valutative solo su metalli e IPA e non sugli analiti che riguardano la presente trattazione.
Si può solo notare che generalmente la variabilità dei risultati sui CRM e quella della validazione dei due metodi è maggiore di quella riscontrata nei risultati dei campioni sperimentali.
Per questo motivo si consiglia di continuare le analisi dei campioni della sperimentazione per verificare se le successive analisi confermano questi andamenti.
Si consiglia comunque che per validare i risultati di laboratori di analisi vengano poste alcune condizioni prima dell'inizio della campagna stessa. Sarebbe necessario concordare le seguenti regole:

- Definire e concordare i metodi da utilizzare per la determinazione di tutti i parametri e controllare la validazione del metodo utilizzato dal laboratorio prima dell'inizio della campagna
- Controllare la partecipazione del laboratorio di analisi a circuiti interlaboratorio sui parametri da analizzare
- Definire la sequenza di analisi da utilizzare
- Etichettare i campioni in modo cieco per il laboratorio di analisi
- Inviare un Materiale di Riferimento cieco da utilizzare in ogni sequenza di analisi al fine di poter controllare i risultati del CRM e quelli dei campioni processati in contemporanea.
- Sarebbe utile richiedere una validazione dei dati con almeno la ripetizione del 10% delle analisi da parte di un altro laboratorio di fiducia da eseguire durante la campagna di prove.

Per quanto sopra detto, si consiglia inoltre che per qualsiasi ulteriore richiesta di validazione di risultati di analisi, di cui si da la piena disponibilità, è necessario che il coinvolgimento di ISPRA sia richiesto a monte della campagna di analisi e non a valle.

Il presente parere tecnico ISPRA, reso a seguito di richiesta della Regione Lombardia prot. n.6244 del 3/2/2017, è da considerarsi quale mera valutazione tecnica specificatamente riferita all'oggetto della richiesta, in concorso con eventuali altri pareri resi da altri soggetti eventualmente individuati.
Il presente parere è reso per la seguente finalità:

- valutazione della qualità di dati analitici di PCDD/PCDF e PCB di campioni di suoli e biomasse vegetali prodotti nella sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro

sulla base dei dati e informazioni presenti nell'Allegato 2.
L'ambito di validità del parere è finalizzato esclusivamente alla predetta finalità.

ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Allegato 1

Verbale interno dell'incontro con staff Servizio Metrologia Ambientale di ISPRA – Roma

Presenti all'incontro per ISPRA

- Dott.ssa Stefania Balzamo
- Dott.ssa Sabrina Barbizzi
- Dott.ssa Monica Potalivo
- Dott Paolo De Zorzi

Presenti all'incontro per GDL Brescia Caffaro

- Prof. Antonio Di Guardo UNINS
- Prof. Giuseppe Raspa UNIROMA1
- Dott.ssa Vanna Maria Sale ERSAF

La riunione si è svolta presso la sede ISPRA di via Castel Romano 100, RM il 15 novembre 2016 dalle ore 11.30 alle 14.00.

Dopo un'iniziale introduzione per fornire elementi conoscitivi del contesto il Prof. Di Guardo è entrato nel merito della questione, ed ha illustrato il confronto dei dati analitici dei campioni di suolo mediante la presentazione mostrata in precedenza alla riunione del GdL del 20.04.2016. Successivamente ha illustrato un'analisi sintetica dei risultati in forma di istogramma e di curva cumulata, elaborata dal Prof. Raspa, allo scopo di meglio evidenziare i problemi di scarsa variabilità dei trattamenti e dei controlli.

In particolare si è evidenziato come una quota importante dei dati abbia dei coefficienti di variazione inferiori al 5%, numero, evidenziato anche nello scambio di mail precedente con la Dott.ssa Balzamo, come la minima variabilità analitica riscontrabile nelle misure di PCB, diossine e furani.

Il gruppo "ISPRA" nella sua totalità ha ritenuto che i dati mostrati (stampe dei file dei dati analitici sui campioni di suolo T0 e T2 inviati da Indam in data 10.03.2016) presentino una variabilità anomala in quanto molto al di sotto di quella normalmente riscontrata nella pratica e nella letteratura analitica internazionale.

La Dott.ssa Potalivo ha riferito che nella sua pratica di laboratorio, per questo tipo di sostanze, la sola variabilità analitica (ovvero quella che si ricava iniettando lo stesso standard più volte) possa produrre coefficienti di variazione intorno al 15%.

In generale il gruppo "ISPRA" ha concordato sul fatto che la variabilità complessiva risultante dal completo trattamento del campione (campionamento, preparazione, estrazione, purificazione, analisi strumentale) debba essere superiore a quella solo analitica. Pertanto, il loro parere informale supporta il giudizio sulle anomalie rilevate in merito alla estrema improbabilità di ottenere una variabilità così bassa come quella che si ricava dai dati Indam.

Alla presa visione dei dati di incertezza dei campioni T0 e T2 (generalmente attestantesi attorno al 40%) hanno riscontrato un'incongruenza rispetto alla bassa variabilità delle repliche dei risultati finali (<5%).

Come indagini successive hanno suggerito di chiedere a Indam il rapporto di validazione (che riporta valori e modalità di calcolo dell'incertezza, della riproducibilità e bias) e, visto il loro accreditamento e le richieste specificate nel bando di gara, anche i dati sulle analisi del materiale di riferimento certificato (CRM o MRC), e in particolare della sua variabilità. Hanno suggerito inoltre di chiedere informazioni anche sulla ripetibilità strumentale e su alcune particolarità, come la modalità di integrazione dei picchi (manuale o automatica)

ed eventualmente ottenere per alcuni trattamenti e le loro ripetizioni i file dei cromatogrammi prodotti dagli strumenti.

Hanno suggerito inoltre, come possibile prova successiva, la ripetizione del 10% delle analisi da parte di ARPA in quanto ente di riferimento territoriale che possa certificare la validità dei risultati.

Tuttavia, vista la delicatezza della problematica, l'importanza dell'uso di questi dati nel contesto della bonifica del SIN Brescia – Caffaro, e vista anche la complessità giuridica e temporale di una controversia legale con Indam, hanno suggerito di utilizzare le clausole di rescissione presenti nel bando di gara legate al mancato rispetto dei tempi di consegna consigliando infine di non conferire a Indam ulteriori campioni.

Firmato:

Antonio Di Guardo

Vanna Maria Sale

Giuseppe Raspa

ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Allegato 2

Documenti elaborati da: Prof. Di Guardo dell'Università dell'Insubria, la Prof.ssa Sara Bodin dell'Università degli Studi di Milano e il Prof. Randa dell'Università "La Sapienza" di Roma e dai loro collaboratori.

- Rel.Tecnico-Scient_12.01.2017.pdf
- UNINSUBRIA - LA SAPIENZA - Analisi dell'incertezza.pdf

Documenti INDAM Laboratori srl

- Validazione PCB MTH 410
  - RGP107A MTH 410 rev.0
- Validazione PCDD-DF MTH332
  - RGP107A MTH 332 rev.00 e rev.01

Risultati analisi INDAM Laboratori srl

- Matrici certificate: dati + certificati dei CRM
- Classi di clorurazione 13378-80
- Classi di clorurazione 13420-22
- File di quantificazione 13378-80 pcb
- File di quantificazione 13378-80 pcdd
- Quaderno pesate 13378-80
- File di quantificazione 13420-22 pcb
- File di quantificazione 13420-22 pcdd
- Quaderno pesate 13420-22
- Ris. Analisi T0:
  - TERRENI_ERSAf-com 6911
  - ERSAF terreni - con incertezza misura e LOQ.xlsx

- Ris. Analisi T2:
  - TERRENI_ERSAF.6913.xlsx
  - ERSAF terreni - con incertezza misura e LOQ.xlsx

Indam
Analisi studi e ricerche applicate
al settore ambientale e controllo qualità.

Indam Laboratori srl
25030 Castelmella (Brescia) - v. Redipuglia 33/39
tel. 030 2585203 (r.a.) - fax amm.ne 030 2786584
fax lab. 030 2585291 - fax ambiente 030 2584782
c.f. e p.iva IT 03379190980 - r.e.a. BS 529364
www.indam.it - info@indam.it

Allegato 3

Castelmella, 13/01/2016

Oggetto: relazione tecnica analisi di microinquinanti organici ed inorganici relativa al progetto "SPERIMENTAZIONE DI TECNICHE DI BIORIMEDIO S.I.N. BRESCIA -CAFFARO"

Preparazione del campione di terreno

La procedura impiegata per la preparazione del campione fa riferimento al metodo JLC (japanese slab cake) effettuata sul campione tal quale non essiccato, così come consegnato al laboratorio. Sono formate 5 aliquote, ognuna di circa 10 grammi, formate da almeno 30 prelievi incrementali :

- Per la determinazione di PCDD/PCDF e PCB
- Per la determinazione di Pesticidi DDD, DDE, DDT
- Per la determinazione di metalli e carbonio organico, macinata finemente in mulino a dischi a bassa cessione (per l'avvinamento del sistema di macinazione potrebbe essere necessario effettuare più di 30 incrementi per formare un'aliquota maggiore di 10 grammi)
- Per la determinazione del residuo secco a 105°C
- Per eventuali ricontrolli o altre necessità

Sono effettuate prove di bianco utilizzando terre di diatomee (Thermo ASE Prep DE Diatomaceus Earth) seguendo il metodo JLC come per i campioni di terreno.

PCDD/PCDF e PCB

La procedura impiegata per la determinazione di diossine e furani nei campioni di terreno fa riferimento al metodo EPA 1613 B (1994), che prevede l'estrazione dei campioni, la purificazione dell'estratto, e l'analisi in HRGC/HRMS.
La procedura impiegata per la determinazione di PCB nei campioni di terreno fa riferimento al metodo EPA 1668 C (2010) e prevede l'estrazione dei campioni, la purificazione dell'estratto, e l'analisi in HRGC/HRMS.

A 10 g di terreno mescolati con terra di diatomee sono aggiunti i seguenti standard marcati di estrazione degli analiti:

Congenere	Quantità (ng)
2,3,7,8 TCDD 13C12	2
1,2,3,7,8 PeCDD 13C12	2
1,2,3,4,7,8 HxCDD 13C12	2
1,2,3,6,7,8 HxCDD 13C12	2
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD 13C12	2
OCDD 13C12	4
2,3,7,8 TCDF 13C12	2
1,2,3,7,8 PeCDF 13C12	2
2,3,4,7,8 PeCDF 13C12	2
1,2,3,4,7,8 HxCDF 13C12	2
1,2,3,6,7,8 HxCDF 13C12	2
2,3,4,6,7,8 HxCDF 13C12	2
1,2,3,7,8,9 HxCDF 13C12	2
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	2

Congenere	Quantità (ng)
PCB 81 13C12	2
PCB 77 13C12	2
PCB 123 13C12	2
PCB 118 13C12	2
PCB 114 13C12	2
PCB 105 13C12	2
PCB 126 13C12	2
PCB 167 13C12	2
PCB 156 13C12	2
PCB 157 13C12	2
PCB 169 13C12	2
PCB 189 13C12	2
PCB 1 13C12	2
PCB 3 13C12	2

Indam Laboratori srl
25030 Castelmella (Brescia) - v. Redipuglia 33/39
tel. 030 2585203 (r.a.) - fax amm.ne 030 2786584
fax lab. 030 2585291 - fax ambiente 030 2584782
c.f. e p.iva IT 03379190980 - r.e.a. BS 529364
www.indam.it - info@indam.it

13C12	
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF 13C12	2

PCB 4 13C12	2
PCB 15 13C12	2
PCB 19 13C12	2
PCB 37 13C12	2
PCB 54 13C12	2
PCB 104 13C12	2
PCB 155 13C12	2
PCB 188 13C12	2
PCB 202 13C12	2
PCB 205 13C12	2
PCB 208 13C12	2
PCB 206 13C12	2
PCB 209 13C12	2

I campioni sono estratti mediante Accelerated Solvent Exctractor Thermo Scientific DIONEX ASE 350, usando come solvente toluene ed eventualmente una piccola parte di acetone (solventi puri per analisi di residui di pesticidi) in caso di terreni molto umidi, con il seguente metodo:

T	150 °C
Heat	7 min
Static time	7 min
Cycles	2
Rinse volume	60%
Purge	180 s
Cell type	SST

Prima della purificazione gli estratti sono aggiunti dei seguenti standard di clean-up:

- per PCDD/PCDF: 1 ml di soluzione di 2,3,7,8-TCDD 37Cl35 a 0,2 ng/ml,
- per PCB: 1 ml di soluzione di PCB111 13C12 e PCB178 13C12 a 2 ng/ml,

e sono purificati e frazionati su colonne di silica/allumina FMS mediante sistema FMS POWER-PREP con il seguente metodo (esano puro per analisi di residui di pesticidi, diclorometano puro per HPLC):

STEP	FLOW (ml/min)	Vol. (ml)	DESCRIZIONE
1	10	10	Carica esano
2	10	30	Bagna allumina
3	10	100	Bagna e cond. silice
4	5	10	Carica campione
5	5	75	Eluizione esano
6	10	12	Cambio diclorometano 7% esano
7	10	100	Eluizione PCB diclorometano 7% in esano
8	10	12	Cambio diclorometano 7% in esano
9	5	120	Eluizione PCDD/PCDF diclorometano 80% in esano
10	5	2	Purge
11	1	0,1	Spegni valvole

Gli estratti purificati, portati a piccolo volume in corrente di azoto, sono analizzati mediante gascromatografo Thermo Scientific TRACE GC ULTRA accoppiato allo spettrometro di massa Thermo Scientific DFS, previa aggiunta dei seguenti standard di iniezione:

Indam Laboratori srl
25030 Castelmella (Brescia) - v. Redipuglia 33/39
tel. 030 2585203 (r.a.) - fax amm.ne 030 2786584
fax lab. 030 2585291 - fax ambiente 030 2584782
c.f. e p.iva IT 03379190980 - r.e.a. BS 529364
www.indam.it - info@indam.it

- per PCDD/PCDF: 10 µl di soluzione di 1,2,3,4-TCDD 13C12 e 1,2,3,7,8,9-HxCDD 13C12 a 200ng/ml,
- per PCB: 2 µl di standard di PCB52 13C12, PCB101 13C12 e PCB138 13C12 a 1000ng/ml.

Di seguito sono riportate le condizioni strumentali:

	PCDD/PCDF	**PCB**
Iniettore	Splitless	Splitless
T iniettore	260°C	260°C
Colonna	RTX Dioxin 2 (60m, 0.25 mm, 0.25 µm)	HT8 PCB (60m, 0.25mm)
Flusso in colonna	1 ml/min	1 ml/min
Programmata	130°C per 1 min, 40°C/min fino a 200°C, 3°C/min fino a 235°C, 5°C/min fino a 300°C, 300°C per 25 min	100°C, 30°C/min fino a 180°C, 2°C/min fino a 260°C, 5°C/min fino a 300°C, a 300°C per 4.40 min
T interfaccia GC-MS	270°C	270°C
T sorgente	290°C	290°C
Ionizzazione	EI+ 45 eV	EI+ 45 eV
Risoluzione	≥10000	≥10000
Masse acquisite	M+ - M+2 (classi tetra-penta clorurate) M+2 - M+4 (classi esa-epta-octa clorurate)	M+ - M+2 (classi mono-di-tri-tetra-penta clorurate) M+2 - M+4 (classi esa-epta-octa-nona clorurate) M+2 - M+4 (PCB 209)

Di seguito vengono riportati gli analiti da ricercare ed i relativi standard interni utilizzati per la quantificazione:

	analita	std interno 13C12 usato per la quantificazione
mono	PCB1	PCB1
	PCB3	PCB3
di	PCB4	PCB4
	PCB6	PCB4
	PCB8	PCB4
	PCB10	PCB4
	PCB15	PCB15
tri	PCB16	PCB37
	PCB18	PCB37
	PCB19	PCB19
	PCB22	PCB37
	PCB28	PCB37
	PCB31	PCB37
	PCB33	PCB37
	PCB37	PCB37
tetra	PCB40	PCB81
	PCB41	PCB81
	PCB44	PCB81
	PCB49	PCB81
	PCB52	PCB81
	PCB54	PCB54
	PCB60	PCB81

Indam Laboratori srl
25030 Castelmella (Brescia) - v. Redipuglia 33/39
tel. 030 2585203 (r.a.) - fax amm.ne 030 2786584
fax lab. 030 2585291 - fax ambiente 030 2584782
c.f. e p.iva IT 03379190980 - r.e.a. BS 529364
www.indam.it - info@indam.it

	PCB66	PCB81
	PCB70	PCB81
	PCB74	PCB81
	PCB77	PCB77
	PCB81	PCB81
penta	PCB84	PCB123
	PCB85	PCB123
	PCB87	PCB123
	PCB90 + PCB101	PCB123
	PCB95	PCB123
	PCB97	PCB123
	PCB99	PCB123
	PCB104	PCB104
	PCB105	PCB105
	PCB110	PCB123
	PCB114	PCB114
	PCB118	PCB118
	PCB119	PCB123
	PCB123	PCB123
	PCB126	PCB126
esa	PCB128	PCB169
	PCB129	PCB169
	PCB137	PCB169
	PCB138	PCB169
	PCB141	PCB169
	PCB146	PCB169
	PCB149	PCB169
	PCB151	PCB169
	PCB153 + PCB168	PCB169
	PCB156	PCB156
	PCB157	PCB157
	PCB158	PCB169
	PCB167	PCB167
	PCB169	PCB169
epta	PCB170	PCB189
	PCB171	PCB189
	PCB177	PCB189
	PCB180	PCB189
	PCB183	PCB189
	PCB187	PCB189
	PCB189	PCB189
	PCB191	PCB189
	PCB193	PCB189
octa	PCB194	PCB205
	PCB196 + PCB203	PCB205
	PCB199	PCB205
	PCB200	PCB205
	PCB201	PCB205
	PCB202	PCB202
	PCB205	PCB205
nona	PCB206	PCB206
	PCB207	PCB206

Indam Laboratori srl
25030 Castelmella (Brescia) - v. Redipuglia 33/39
tel. 030 2585203 (r.a.) - fax amm.ne 030 2786584
fax lab. 030 2585291 - fax ambiente 030 2584782
c.f. e p.iva IT 03379190980 - r.e.a. BS 529364
www.indam.it - info@indam.it

	PCB208	PCB208
deca	PCB209	PCB209

Pesticidi DDD, DDE, DDT

Per la determinazione di pesticidi DDD, DDE, DDT nei terreni è applicato un metodo interno al laboratorio (MPI 04130 CH - rev. 6), che prevede l'estrazione dei campioni, la purificazione degli estratti, e l'analisi in GC/MS.

I campioni di terreno sono estratti con due aliquote da 50 ml di acetone:diclorometano 1:1 (acetone puro per analisi di residui di pesticidi, diclorometano puro per HPLC) in bagno ultrasuoni e concentrati.

Gli estratti ottenuti sono purificati su cartucce STRATA FLORISIL (6 ml, 1000 mg). L'eluizione dei pesticidi è realizzata con 5 ml di etere etilico:esano 6:94, 5 ml di etere etilico:esano 15:85 e 5 ml di etere etilico:esano 50:50 (etere etilico grado ACS, esano puro per analisi di residui di pesticidi).

Gli estratti, portati a secchezza e ripresi con 1 ml di isottano (puro per analisi di residui di pesticidi), sono analizzati mediante gascromatografo Agilent 7890A accoppiato allo spettrometro di massa Agilent 5975 C, previa aggiunta dello standard interno. Di seguito sono riportate le condizioni strumentali:

Iniettore	Splitless
T iniettore	250°C
Colonna	HP-5MS UI (30m, 0.25 mm, 0.25 µm)
Flusso in colonna	1 ml/min
Programmata	85°C per 3 min, 5°C/min fino a 280°C, 40°C/min fino a 300°C, 300°C per 3 min
T sorgente	230°C
Ionizzazione	EI+ 70 eV
Masse acquisite	SIM o-p'DDE: 246, 248; p-p'DDE:246, 318; o-p'DDD:235, 237; p-p'DDD:235, 237; o-p'DDT:235, 237; p-p'DDT:235, 237

I campioni nei quali è rilevata una bassa concentrazione di pesticidi sono analizzati in GC/MS/MS. L'analisi è eseguita mediante gascromatografo Shimadzu GC-2010 PLUS (SC/359/01) accoppiato allo spettrometro di massa Shimadzu TQ 8030 EI (SC/359/02), con le seguenti condizioni strumentali:

Iniettore	PTV
T iniettore	270°C
Colonna	HP-5MS UI (30m, 0.25 mm, 0.25 µm)
Flusso in colonna	1.5 ml/min
Programmata	50°C per 1 min, 25°C/min fino a 125°C, 10°C/min fino a 300°C, 300°C per 15 min
T sorgente	230°C
Ionizzazione	EI+ 70 eV
Masse acquisite	MS/MS o-p'DDE: 246→176, 246→211; p-p'DDE: 246→176, 246→211; o-p'DDD: 235→165, 235→199; p-p'DDD: 235→165, 235→199; o-p'DDT: 235→165, 235→199; p-p'DDT: 235→165, 235→199

Metalli:

Indam Laboratori srl
25030 Castelmella (Brescia) - v. Redipuglia 33/39
tel. 030.2585203 (r.a.) - fax amm.ne 030.2786584
fax lab. 030.2585291 - fax ambiente 030.2584782
c.f. e p.iva IT 03379190980 - r.e.a. BS 529364
www.indam.it - info@indam.it

La procedura impiegata per la determinazione dei metalli nei campioni di terreno fa riferimento al metodo DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994, che prevede la mineralizzazione di circa 1 grammo di terreno con la miscela di 9 ml HCL (≥ 37%, puriss. p.a.), 3 ml HNO_3 (≥ 65%, puriss. p.a.), 1 ml H_2O_2 (≥ 30%, traceSELECT ULTRA) e dosaggio dopo opportuna diluizione in ICP-MS (Agilent 7500CE). Di seguito sono riportate le condizioni strumentali:

RF Power	1580 W
RF Matching	1.66 V
Carrier Gas	He 0.81 l/min
Mekeup Gas	He 0.21 l/min
Nebulizer Pump	0.1 rps
S/C Temp	2 degC
Reaction Gas	He

I campioni nei quali è rilevata una bassa concentrazione di mercurio sono analizzati con tecnica più sensibile e strumento dedicato (Milestone DMA-80) basato su decomposizione termica del campione, accumulo su amalgama e determinazione finale in assorbimento atomico secondo la metodica EPA 7473 2007. Di seguito sono riportate le condizioni strumentali:

T essiccazione	200°C
T decomposizione	650 °C
Rilevazione	254 nm

Carbonio:

La procedura impiegata per la determinazione del carboni organico fa riferimento al metodo UNI EN 13137:2002 che prevede la conversione in CO_2 del carbonio organico mediante combustione e misura spettrofotometrica a infrarossi mediante analizzatore elementare Elementar VarioMACROcube.

La natura dei campioni e le concentrazioni riscontrate potranno rendere necessario eventuali modifiche alle procedure sopra citate

Cordiali saluti

National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1944

New York/New Jersey Waterway Sediment

Standard Reference Material (SRM) 1944 is a mixture of marine sediment collected near urban areas in New York and New Jersey. SRM 1944 is intended for use in evaluating analytical methods for the determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyl (PCB) congeners, chlorinated pesticides, and trace elements in marine sediment and similar matrices. Reference values are also provided for selected polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners, selected dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran congeners, total organic carbon, total extractable material, and particle size characteristics. Information values are provided for selected polychlorinated naphthalenes (PCNs) and hexabromocyclododecanes (HBCDs). All of the constituents for which certified, reference, and information values are provided in SRM 1944 were naturally present in the sediment before processing. A unit of SRM 1944 consists of a bottle containing 50 g of radiation-sterilized, freeze-dried sediment.

Certified Mass Fraction Values: Certified values for mass fractions of PAHs, PCB congeners, chlorinated pesticides, and trace elements are provided in Tables 1 through 4. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. The certified values for the PAHs, PCB congeners, and chlorinated pesticides are based on the agreement of results obtained at NIST using two or more chemically independent analytical techniques. The certified values for the trace elements are based on NIST measurements by one technique and additional results from several collaborating laboratories.

Reference Mass Fraction Values: Reference values are provided for mass fractions of additional PAHs (some in combination) in Tables 5 and 6, additional PCB congeners and chlorinated pesticides in Table 7, PBDE congeners in Table 8, and additional inorganic constituents in Tables 9 and 10. Reference values are provided in Table 11 for the 2,3,7,8-substituted polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran congeners and total tetra-, penta-, hexa-, and hepta-congeners of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran. Reference values for particle size characteristics are provided in Table 12 and 13. Reference values for total organic carbon and percent extractable mass are provided in Table 14. Reference values are noncertified values that are the best estimate of the true value; however, the values do not meet the NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods [1].

Information Mass Fraction Values: Information values are provided in Table 15 for mass fractions of additional trace elements, in Table 16 for PCN congeners (some in combination), and in Table 17 for HBCD isomers. An information value is considered to be a value that will be of interest and use to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value or only a limited number of analyses were performed [1]. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

Expiration of Certification: The certification of **SRM 1944** is valid, within the measurement uncertainty specified, until **31 March 2027**, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Handling, Storage, and Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Carlos A. Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 17 February 2017
Certificate Revision History on Page 20

Steven J. Choquette, Director
Office of Reference Materials

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification was performed by M.M. Schantz and S.A. Wise of the NIST Chemical Sciences Division.

Consultation on the statistical design of the experimental work and evaluation of the data were provided by S.D. Leigh, M.G. Vangel, and M.S. Levenson of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

The sediment was collected with the assistance of the New York District of the U.S. Army Corp of Engineers (ACENYD), who provided the expertise in the site selection, the ship, sampling equipment, and personnel. L. Rosman of ACENYD and R. Parris (NIST) coordinated the collection of this sediment. Collection and preparation of SRM 1944 were performed by R. Parris, M. Cronise, and C. Fales (NIST); L. Rosman and P. Higgins (ACENYD), and the crew of the *Gelberman* from the ACE Caven Point facility in Caven Point, NJ.

Analytical measurements for the certification of SRM 1944 were performed at NIST by E.S. Beary, D.A. Becker, R.R. Greenberg, J.M. Keller, J.R. Kucklick, M. Lopez de Alda, K.E. Murphy, R. Olfaz, B.J. Porter, D.L. Poster, L.C. Sander, P. Schubert, M.M. Schantz, S.S. Vander Pol, and L. Walton of the Analytical Chemistry Division. Measurements for percent total organic carbon measurements were provided by three commercial laboratories and T.L. Wade of the Geochemical and Environmental Research Group, Texas A&M University (College Station, TX, USA). The particle-size distribution data were provided by Honeywell, Inc. (Clearwater, FL, USA). Additional results for PBDE congeners were used from ten laboratories (see Appendix A) that participated in an interlaboratory study specifically for PBDEs in Marine Sediment coordinated by H.M. Stapleton of the NIST Analytical Chemistry Division. M. LaGuardia of Virginia Institute of Marine Science (Gloucester Point, VA, USA) provided one set of measurements for the HBCDs.

Values for the polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans were the results of an interlaboratory comparison study among fourteen laboratories (see Appendix B) coordinated by S.A. Wise of the NIST Analytical Chemistry Division and R. Turle and C. Chiu of Environment Canada Environmental Technology Centre, Analysis and Air Quality Division (Ottawa, ON, Canada). Analytical measurements for selected trace elements were provided by the International Atomic Energy Agency (IAEA, Seibersdorf, Austria) by M. Makarewicz and R. Zeisler. Results were also used from seven laboratories (see Appendix C) that participated in an intercomparison exercise coordinated by S. Willie of the Institute for National Measurement Standards, National Research Council Canada (NRCC; Ottawa, ON, Canada).

INSTRUCTIONS FOR HANDLING, STORAGE, AND USE

Handling: This material is naturally occurring marine sediment from an urban area and may contain constituents of unknown toxicities; therefore, caution and care should be exercised during its handling and use.

Storage: SRM 1944 must be stored in its original bottle at temperatures less than 30 °C away from direct sunlight.

Use: Prior to removal of test portions for analysis, the contents of the bottle should be mixed. The concentrations of constituents in SRM 1944 are reported on a dry-mass basis. The SRM, as received, contains a mass fraction of approximately 1.3 % moisture. The sediment sample should be dried to a constant mass before weighing for analysis or, if the constituents of interest are volatile, a separate test portion of the sediment should be removed from the bottle at the time of analysis and dried to determine the mass fraction on a dry-mass basis.

PREPARATION AND ANALYSIS[(1)]

Sample Collection and Preparation: The sediment used to prepare this SRM was collected from six sites in the vicinity of New York Bay and Newark Bay in October 1994. Site selection was based on contaminant levels measured in previous samples from these sites and was intended to provide relatively high concentrations for a variety of chemical classes of contaminants. The sediment was collected using an epoxy-coated modified Van Veen-type grab sampler designed to sample the sediment to a depth of 10 cm. A total of approximately 2100 kg of wet sediment was collected from the six sites. The sediment was freeze-dried, sieved (nominally 250 μm to 61 μm), homogenized in a cone blender, radiation sterilized at an estimated minimum dose of 32 kilograys (^{60}Co), and then packaged in screw-capped amber glass bottles.

Conversion to Dry-Mass Basis: The results for the constituents in SRM 1944 are reported on a dry-mass basis; however, the material as received contains residual moisture. The amount of moisture in SRM 1944 was determined by measuring the mass loss after freeze drying test portions of 1.6 g to 2.5 g for five days at 1 Pa with a –10 °C shelf temperature and a –50 °C condenser temperature. The mass fraction of moisture in SRM 1944 at the time of the certification analyses was 1.25 % ± 0.03 % (95 % confidence level).

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: The general approach used for the value assignment of the PAHs in SRM 1944 consisted of combining results from analyses using various combinations of different extraction techniques and solvents, cleanup/isolation procedures, and chromatographic separation and detection techniques [2]. Techniques and solvents involved were Soxhlet extraction and pressurized fluid extraction (PFE) using dichloromethane (DCM) or a hexane/acetone mixture, clean up of the extracts using solid-phase extraction (SPE), or normal-phase liquid chromatography (LC), followed by analysis using the following techniques: (1) reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FL) analysis of the total PAH fraction, (2) reversed-phase LC-FL analysis of isomeric PAH fractions isolated by normal-phase LC (i.e., multidimensional LC), (3) gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis of the PAH fraction on four stationary phases of different selectivity, i.e., a 5 % (mole fraction) phenyl-substituted methylpolysiloxane phase, a 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase, a proprietary non-polar polysiloxane phase, and a smectic liquid crystalline stationary phase.

Seven sets of GC/MS results, designated as GC/MS (I), GC/MS (II), GC/MS (III), GC/MS (IV), GC/MS (V), GC/MS (VI), and GC/MS (Sm), were obtained using four columns with different selectivities for the separation of PAHs. For GC/MS (I) analyses, duplicate test portions of 1 g from eight bottles of SRM 1944 were Soxhlet extracted for 24 h with DCM. Copper powder was added to the extract to remove elemental sulfur. The concentrated extract was passed through a silica SPE cartridge and eluted with 2 % DCM in hexane. (All extraction and LC solvent compositions are expressed as volume fractions unless otherwise noted.) The processed extract was then analyzed by GC/MS using a 0.25 mm i.d. × 60 m fused silica capillary column with a 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase (0.25 μm film thickness) (DB-5 MS, J&W Scientific, Folsom, CA). The GC/MS (II) analyses were performed using 1 g to 2 g test portions from three bottles of SRM 1944 and 2 g to 3 g test portions from three bottles of SRM 1944 that had been mixed with a similar amount of water (i.e., a wetted sediment). These test portions were Soxhlet extracted with DCM and processed through the silica SPE as described above; however, the extract was further fractionated using normal-phase LC on a semi-preparative aminopropylsilane column to isolate the PAH fraction. The PAH fraction was then analyzed using the same column as described above for GC/MS (I); however, the test portions were extracted, processed, and analyzed as part of three different sample sets at different times using different calibrations for each set. For the GC/MS (III), 1 g to 2 g test portions from six bottles of SRM 1944 were Soxhlet extracted for 18 h with 250 mL of a mixture of 50 % hexane/50 % acetone. The extracts were then processed and analyzed as described for GC/MS (II). For GC/MS (IV) analyses, 1 g to 2 g test portions from six bottles of SRM 1944 were extracted using PFE with a mixture of 50 % hexane/50 % acetone, and the extracts were processed as described above for GC/MS (II). The GC/MS (V) results were obtained by analyzing three of the same PAH fractions that were analyzed in GC/MS (III) and three of the PAH fractions that were analyzed in GC/MS (IV) using a 50 % (mole fraction) phenyl-substituted methylpolysiloxane stationary phase (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness) (DB-17MS, J&W Scientific, Folsom, CA). For GC/MS (VI) analyses, three test portions of 0.7 g from one bottle of SRM 1944 were Soxhlet extracted for 24 h with DCM. Copper powder was added to the extract to remove elemental sulfur. The concentrated extract was passed through an aminopropyl SPE cartridge and eluted with 20 % DCM in hexane. The processed extract was then analyzed by GC/MS using a 0.25 mm i.d. × 60 m fused silica capillary column with a proprietary non-polar polysiloxane phase (0.25 μm film thickness) (DB-XLB, J&W Scientific). For GC/MS (Sm) 1 g to 2 g test portions from six bottles of SRM 1944 were Soxhlet extracted for 24 h

[(1)]Certain commercial equipment, instruments, or materials are identified in this report to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

with 250 mL of DCM. The extracts were processed as described above for GC/MS (I) using an aminopropylsilane SPE cartridge followed by GC/MS analysis using 0.2 mm i.d. × 25 m (0.15 μm film thickness) smectic liquid crystalline phase (SB-Smectic, Dionex, Lee Scientific Division, Salt Lake City, UT).

Two sets of LC-FL results, designated as LC-FL (Total) and LC-FL (Fraction), were used in the certification process. Test portions of approximately 1 g from six bottles of SRM 1944 were Soxhlet extracted for 20 h using 200 mL of 50 % hexane/50 % acetone. The extracts were concentrated and then processed through two aminopropylsilane SPE cartridges connected in series to obtain the total PAH fraction. A second 1 g test portion from the six bottles was Soxhlet extracted and processed as described above; the PAH fraction was then fractionated further on a semi-preparative aminopropylsilane column (μBondapak NH_2, 9 mm i.d. × 30 cm, Waters Associates, Milford, MA) to isolate isomeric PAH fractions. The total PAH fraction and the isomeric PAH fractions were analyzed using a 5-μm particle-size polymeric octadecylsilane (C_{18}) column (4.6 mm i.d. × 25 cm, Hypersil-PAH, Keystone Scientific, Inc., Bellefonte, PA) with wavelength-programmed fluorescence detection. For all of the GC/MS and LC-FL measurements described above, selected perdeuterated PAHs were added to the sediment prior to solvent extraction for use as internal standards for quantification purposes.

Homogeneity Assessment for PAHs: The homogeneity of SRM 1944 was assessed by analyzing duplicate test portions of 1 g from eight bottles selected by stratified random sampling. Test portions were extracted, processed, and analyzed as described above for GC/MS (I). No statistically significant differences among bottles were observed for the PAHs at the 1 g test portion size.

PAH Isomers of Molecular Mass 300 and 302: For the determination of the molecular mass 300 and 302 PAH isomers, three test portions of approximately 5 g each were extracted using PFE with DCM. The extracts were then concentrated with a solvent change to hexane and passed through an aminopropyl SPE cartridge and eluted with 10 % DCM in hexane. The processed extract was then analyzed by GC/MS using a 0.25 mm i.d. × 60 m fused silica capillary column with a 50 % phenyl-substitued methylpolysiloxane phase (0.25 μm film thickness; DB-17MS, J&W Scientific, Folsom, CA). Perdeuterated dibenzo[*a*,*i*]pyrene was added to the sediment prior to extraction for use as an internal standard.

PCBs and Chlorinated Pesticides: The general approach used for the determination of PCBs and chlorinated pesticides in SRM 1944 consisted of combining results from analyses using various combinations of different extraction techniques and solvents, cleanup/isolation procedures, and chromatographic separation and detection techniques [2]. This approach consisted of Soxhlet extraction and PFE using DCM or a hexane/acetone mixture, clean up/isolation using SPE or LC, followed by analysis using GC/MS and gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD) on two columns with different selectivity.

Eight sets of results were obtained designated as GC-ECD (I) A and B, GC-ECD (II) A and B, GC/MS (I), GC/MS (II), GC/MS (III), and QA Exercise. For the GC-ECD (I) analyses, 1 g test portions from four bottles of SRM 1944 were Soxhlet extracted with DCM for 18 h. Copper powder was added to the extract to remove elemental sulfur. The concentrated extract was passed through a silica SPE cartridge and eluted with 10 % DCM in hexane. The concentrated eluant was then fractionated on a semi-preparative aminopropylsilane column to isolate two fractions containing: (1) the PCBs and lower polarity pesticides and, (2) the more polar pesticides. GC-ECD analyses of the two fractions were performed on two columns of different selectivities for PCB separations: 0.25 mm × 60 m fused silica capillary column with a 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase (0.25 μm film thickness) (DB-5, J&W Scientific, Folsom, CA) and a 0.32 mm × 100 m fused silica capillary column with a 50 % (mole fraction) octadecyl (C18) methylpolysiloxane phase (0.1 μm film thickness) (CPSil 5 C18 CB, Chrompack International, Middelburg, The Netherlands). The results from the 5 % phenyl phase are designated as GC-ECD (IA) and the results from the C18 phase are designated as GC-ECD (IB). A second set of samples was also analyzed by GC-ECD (i.e., GC-ECD IIA and IIB). Test portions of 1 g to 2 g from three bottles of SRM 1944 and 2 g to 3 g test portions from three bottles of SRM 1944 that had been mixed with a similar amount of water (i.e., a wetted sediment) were extracted, processed, and analyzed as described above for GC-ECD (I); however, the test portions were extracted, processed and analyzed as part of three different sample sets at different times using different calibrations for each set.

Three sets of results were obtained by GC/MS. For GC/MS (I), 1 g to 2 g test portions from six bottles were Soxhlet extracted with a mixture of 50 % hexane/50 % acetone. Copper powder was added to the extract to remove elemental sulfur. The concentrated extract was passed through a silica SPE cartridge and eluted with 10 % DCM in hexane. The extract was then analyzed by GC/MS using a 0.25 mm × 60 m fused silica capillary column with a 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase (0.25 μm film thickness). The GC/MS (II) results were obtained in the same manner as the GC/MS (I) analyses except that the six test portions were extracted using PFE. The GC/MS (III) analyses were performed on the same extract fractions analyzed in GC-ECD (II) using the 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase describe above for GC/MS (I). For both the GC-ECD and GC/MS analyses, two PCB congeners that are not significantly present in the sediment extract (PCB 103 and PCB 198 [3]), and 4,4'-DDT-d_8 were added to the sediment prior to extraction for use as internal standards for quantification purposes.

In addition to the analyses performed at NIST, SRM 1944 was used in an interlaboratory comparison exercise in 1995 as part of the NIST Intercomparison Exercise Program for Organic Contaminants in the Marine Environment [4]. Results from nineteen laboratories that participated in this exercise were used as the eighth data set in the determination of the certified values for PCB congeners and chlorinated pesticides in SRM 1944. The laboratories participating in this exercise used the analytical procedures routinely used in their laboratories to measure PCB congeners and chlorinated pesticides.

Polybrominated Diphenyl Ethers: Value assignment of the concentrations of eight PBDE congeners was based on the means of results from two interlaboratory studies [5,6] and two sets of data from NIST. The laboratories participating in the interlaboratory exercises (see Appendix A) employed the analytical procedures routinely used in their laboratories to measure PBDEs. For the two methods used at NIST, six test portions (between 1 g and 2 g) were extracted using PFE at 100 °C with DCM. The extracts were cleaned up using an alumina column (5 % deactivated) SPE column. Size exclusion chromatography (SEC) on a divinylbenzene-polystyrene column (10 μm particle size, 10 nm (100 angstrom) pore size, 7.5 mm i.d. × 300 mm, PL-Gel, Polymer Labs, Inc.) was then used to remove the sulfur. The PBDEs, as well as PCBs and pesticides, were quantified using GC/MS in the electron impact mode on a 0.18 mm i.d. × 30 m fused silica capillary column with a 5 % (mole fraction) phenyl methylpolysiloxane phase (0.18 μm film thickness; DB-5MS, Agilent Technologies). The PBDEs were also quantified using GC/MS in the negative chemical ionization mode on a 0.18 mm i.d. × 10 m fused silica capillary column with a 5 % (mole fraction) phenyl methylpolysiloxane phase (0.18 μm film thickness; DB-5MS, Agilent Technologies). Selected Carbon-13 labeled PBDE and PCB congeners were added to the sediment prior to extraction for use as internal standards for quantification purposes.

Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins and Dibenzofurans: Value assignment of the concentrations of the polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran congeners and the total tetra- through hepta- substituted polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans was accomplished by combining results from the analysis of SRM 1944 by fourteen laboratories that participated in an interlaboratory comparison study (see Appendix B). Each laboratory analyzed three test portions (typically 1 g) of SRM 1944 using their routine analytical procedures and high resolution gas chromatography with high resolution mass spectrometry detection (GC-HRMS). The analytical procedures used by all of the laboratories included spiking with ^{13}C-labeled surrogates (internal standards); Soxhlet extraction with toluene; sample extract cleanup with acid/base silica, alumina, and carbon columns; and finally analysis of the cleaned up extract with GC-HRMS. Most of the laboratories used a 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase capillary column (DB-5), and about half of the laboratories confirmed 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran using a 50 % cyanopropylphenyl-substituted methylpolysiloxane (DB-225, J&W Scientific, Folsom, CA) capillary column.

Analytical Approach for Inorganic Constituents: Value assignment for the concentrations of selected trace elements was accomplished by combining results of the analyses of SRM 1944 from NIST, NRCC, IAEA, and seven laboratories that participated in an interlaboratory comparison exercise coordinated by NRCC [7] (see Appendix C). The analytical methods used for the determination of each element are summarized in Table 18. For the certified concentration values listed in Table 4, results were combined from: (1) analyses at NIST using isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICPMS) or instrumental neutron activation analysis (INAA), (2) analyses at NRCC using ID-ICPMS, graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), and/or inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICPOES), (3) analyses at IAEA using INAA, and (4) the mean of the results from seven laboratories that participated in the NRCC interlaboratory comparison exercise. The reference mass fraction values in Table 9 were determined by combining results from (1) analyses performed at NIST using INAA; (2) analyses at NRCC using ID-ICPMS, GFAAS, ICPOES, and/or cold vapor atomic absorption spectroscopy (CVAAS); (3) analyses at IAEA using INAA; and (4) the mean of the results from five to seven laboratories that participated in the NRCC interlaboratory comparison exercise. The information concentration values in Table 15 were determined by INAA at NIST and IAEA.

NIST Analyses using ID-ICPMS: Lead, cadmium, and nickel were determined by ID-ICPMS [8]. Test portions (0.4 g to 0.5 g) from six bottles of the SRM were spiked with ^{206}Pb, ^{111}Cd, and ^{62}Ni and wet ashed using a combination of nitric, hydrochloric, hydrofluoric, and perchloric acids. Lead and cadmium were determined in the same test portions; nickel was determined in a second sample set. A small amount of crystalline material remained after the acid dissolution. Lithium metaborate fusion was performed on this residue to confirm that the residue contained insignificant amounts of the analytes. Cadmium and nickel were separated from the matrix material to eliminate the possibility of spectral interferences, and concentrations were determined from the measurement of the $^{112}Cd/^{111}Cd$ and $^{62}Ni/^{60}Ni$ ratios, respectively. The $^{208}Pb/^{206}Pb$ ratios were measured directly because interferences at these masses are negligible.

NIST Analyses using INAA: Analyses were performed in two steps [9]. Elements with short-lived irradiation products (Al, Ca, Cl, K, Mg, Mn, Na, Ti, and V) were determined by measuring duplicate 300 mg test portions from each of ten bottles of SRM 1944. The samples, standards, and controls were packaged in clean polyethylene bags and were individually irradiated for 15 s in the NIST Reactor Pneumatic Facility RT-4. Reactor power was 20 MW, which corresponds to a neutron fluence rate of about 8×10^{13} $cm^{-2} \cdot s^{-1}$. After irradiation, the samples, controls, and standards were repackaged in clean polyethylene bags and counted (gamma-ray spectrometry) three times at different decay intervals. A sample-to-detector distance (counting geometry) of 20 cm was used. Elements with long-lived irradiation products (Ag, As, Br, Co, Cr, Cs, Fe, Rb, Sb, Sc, Se, Th, and Zn) were determined by measuring one 300 mg test portion from each of nine bottles of SRM 1944. The samples, standards, controls, and blank polyethylene bags were irradiated together for a total of 1 h at a reactor power of 20 MW. Approximately four days after irradiation, the polyethylene bags were removed, and each sample, standard, control, and blank was counted at 20 cm from the detector. The samples were then recounted at 10 cm from another detector. After an additional decay time of about one month, the samples, standards, controls, and blanks were counted a third time (at 10 cm) from the second detector.

Homogeneity Assessment for Inorganic Constitutents: For some of the trace elements, most notably Cd, Fe, Pb, Rb, Sb, Sc, and Th, the variations among the test portions measured at NIST (between 0.3 g and 0.5 g) were larger than expected from the measurement process. Based on experience, it was concluded that there is some material inhomogeneity for trace elements in the test portions used. Sample variations among the NIST measurements are used as slightly conservative estimates of the sample inhomogeneities.

Particle Size Information: Dry particle-size distribution measurements for SRM 1944 were obtained as part of a collaborative effort with Honeywell's Particle and Components Measurements Laboratory (Clearwater, FL). A Microtrac particle analyzer, which makes use of light-scattering techniques, was used to measure the particle-size distribution of SRM 1944. Briefly, a reference beam is used to penetrate a field of particles and the light that scatters in the forward direction from the field is measured and the particle-size as a volume distribution is derived via a computer-assisted analysis. From these data, the total volume, average size, and a characteristic width of the particle size distribution are calculated. The system has a working range from 0.7 μm to 700 μm.

Total Organic Carbon and Percent Extractable Mass: Four laboratories provided results for total organic carbon (TOC) using similar procedures. Briefly, test portions of approximately 200 mg were reacted with 6 mol/L hydrochloric acid and rinsed with deionized water prior to combustion in a gas fusion furnace. The carbon monoxide and carbon dioxide produced were measured and compared to a blank for calculation of the percent TOC. Each laboratory analyzed test portions from six bottles of SRM 1944. For the determination of percent extractable mass, six test portions of approximately 1 g to 2 g of SRM 1944 were extracted using Soxhlet extraction for 18 h with DCM. The extraction thimbles were allowed to air dry. After reaching constant mass, the difference in the mass before and after extraction was determined.

Polychlorinated Naphthalenes: Value assignment of PCN congener concentrations was accomplished by combining results from the analysis of SRM 1944 by six laboratories that participated in an interlaboratory comparison study (see Appendix D). Each laboratory analyzed three test portions (typically 1 g to 2 g) of SRM 1944 using their routine analytical procedures that included high-resolution gas chromatography with either high-resolution mass spectrometry detection (GC-HRMS) or low-resolution MS in the negative chemical ionization mode. Calibration mixtures included either Halowax mixtures with known volume fractions of individual congeners or individual PCN congeners.

HBCDs: Value assignment of the concentrations of three HBCD isomers was accomplished by combining results from the analysis of SRM 1944 in two sets from NIST and one set from Virginia Institute of Marine Science. For the two sets analyzed at NIST, the second fraction from an acidified silica SPE clean-up was analyzed by LC/MS/MS for the HBCDs using both electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressurized photoionization (APPI). A C18 column (3.0 mm × 150 mm × 3.5 µm column, Eclipse Plus, Agilent Technologies) and YMC Carotenoid S5 C30 column (4.6 mm × 250 mm × 5 µm column) were used with a solvent gradient using 2.5 mmol/L ammonium acetate in 12.5 % water in methanol and acetonitrile at a flow rate of 0.3 mL/min. Carbon-13 labeled HBCDs were added to the sediment prior to solvent extraction for use as internal standards for quantification purposes.

The measurands for certified values are the total concentrations of the analytes listed in Tables 1-4. Metrological traceability is to the SI derived units for mass fraction, expressed as milligrams per kilogram, micrograms per kilogram or percentage, respectively.

Table 1. Certified Mass Fraction Values for Selected PAHs in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Mass Fraction[a,b] (mg/kg)		
Phenanthrene[c,d,e,f,g]	5.27	±	0.22
Fluoranthene[c,d,e,f,g]	8.92	±	0.32
Pyrene[c,d,e,f,g]	9.70	±	0.42
Benzo[*c*]phenathrene[c,d,e,f,h]	0.76	±	0.10
Benz[*a*]anthracene[c,d,e,f,g,h]	4.72	±	0.11
Chrysene[h,k]	4.86	±	0.10[i]
Triphenylene[h,k]	1.04	±	0.27
Benzo[*b*]fluoranthene[g,h,j]	3.87	±	0.42
Benzo[*j*]fluoranthene[h,j]	2.09	±	0.44
Benzo[*k*]fluoranthene[c,d,e,f,g,h,j]	2.30	±	0.20
Benzo[*a*]fluoranthene[c,d,e,f,h,,j]	0.78	±	0.12
Benzo[*e*]pyrene[c,d,e,f,h,j]	3.28	±	0.11
Benzo[*a*]pyrene[c,d,e,f,g,h,j]	4.30	±	0.13
Perylene[c,d,e,f,g,h,j]	1.17	±	0.24
Benzo[*ghi*]perylene[c,d,e,f,,j,k]	2.84	±	0.10
Indeno[1,2,3-*cd*]pyrene[c,d,e,f,j,k]	2.78	±	0.10
Dibenz[*a,j*]anthracene[c,d,e,f,,j,k]	0.500	±	0.044
Dibenz[*a,c*]anthracene[,j,k]	0.335	±	0.013
Dibenz[*a,h*]anthracene[j,k]	0.424	±	0.069
Pentaphene[c,d,e,f,,j,k]	0.288	±	0.026
Benzo[*b*]chrysene[c,d,e,f,j,k,h]	0.63	±	0.10
Picene[c,d,e,f,j,k]	0.518	±	0.093

[a] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.

[b] Each certified value is a mean of the means from two or more analytical methods, weighted as described in Paule and Mandel [10].
Each uncertainty, computed according to the Comité International des Poids et Mesures (CIPM) approach as described in the ISO/JCGM Guide [11,12], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty within each analytical method as well as uncertainty due to the drying study. The expanded uncertainty defines a range of values within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of approximately 95 %.

[c] Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (I) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.

[d] GC/MS (II) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.

[e] GC/MS (III) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

[f] GC/MS (IV) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

[g] LC-FL of total PAH fraction after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

[h] GC/MS (Sm) using a smectic liquid crystalline phase after Soxhlet extraction with DCM.

[i] The uncertainty interval for chrysene was widened in accordance with expert consideration of the analytical procedures, along with the analysis of the data as a whole, which suggests that the half-widths of the expanded uncertainties should not be less than 2 %.

[j] GC/MS (V) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase of extracts from GC/MS (III) and GC/MS (IV).

[k] LC-FL of isomeric PAH fractions after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

Table 2. Certified Mass Fraction Values for Selected PCB Congeners[a] in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

		Mass Fraction[b,c] (µg/kg)		
PCB 8	(2,4'-Dichlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	22.3	±	2.3
PCB 18	(2,2',5-Trichlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	51.0	±	2.6
PCB 28	(2,4,4'-Trichlorobiphenyl)[d,e,f,g,j,k]	80.8	±	2.7
PCB 31	(2,4',5-Trichlorobiphenyl)[d,e,f,g,j]	78.7	±	1.6[l]
PCB 44	(2,2'3,5'-Tetrachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	60.2	±	2.0
PCB 49	(2,2'4,5'-Tetrachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	53.0	±	1.7
PCB 52	(2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	79.4	±	2.0
PCB 66	(2,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl)[e,g,h,i,j]	71.9	±	4.3
PCB 95	(2,2',3,5',6-Pentachlorobiphenyl)[e,g,h,i,j]	65.0	±	8.9
PCB 87	(2,2',3,4,5'-Pentachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j]	29.9	±	4.3
PCB 99	(2,2',4,4',5-Pentachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	37.5	±	2.4
PCB 101	(2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	73.4	±	2.5
PCB 105	(2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl)[e,f,g,h,i,j,k]	24.5	±	1.1
PCB 110	(2,3,3',4',6-Pentachlorobiphenyl)[g,h,i,j]	63.5	±	4.7
PCB 118	(2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	58.0	±	4.3
PCB 128	(2,2',3,3',4,4'-Hexachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	8.47	±	0.28
PCB 138	(2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	62.1	±	3.0
PCB 149	(2,2',3,4',5',6-Hexachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	49.7	±	1.2
PCB 151	(2,2',3,5,5',6-Hexachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	16.93	±	0.36
PCB 153	(2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	74.0	±	2.9
PCB 156	(2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j]	6.52	±	0.66
PCB 170	(2,2',3,3',4,4',5-Heptachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	22.6	±	1.4
PCB 180	(2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	44.3	±	1.2
PCB 183	(2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j]	12.19	±	0.57
PCB 187	(2,2',3,4',5,5',6-Heptachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	25.1	±	1.0
PCB 194	(2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j]	11.2	±	1.4
PCB 195	(2,2',3,3',4,4',5,6-Octachlorbiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	3.75	±	0.39
PCB 206	(2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonachlorobiphenyl)[d,e,f,g,h,i,j,k]	9.21	±	0.51
PCB 209	Decachlorobiphenyl[d,e,f,g,h,i,j,k]	6.81	±	0.33

[a] PCB congeners are numbered according to the scheme proposed by Ballschmiter and Zell [13] and later revised by Schulte and Malisch [3] to conform with IUPAC rules; for the specific congeners mentioned in this SRM, the Ballschmiter-Zell numbers correspond to those of Schulte and Malisch.

[b] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.

[c] Each certified value is a mean of the means from two or more analytical methods, weighted as described in Paule and Mandel [10].
Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO/JCGM Guide [11,12], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty within each analytical method as well as uncertainty due to the drying study. The expanded uncertainty defines a range of values within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of approximately 95 %.

[d] GC-ECD (IA) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.

[e] GC-ECD (IB) on the 50 % C-18 dimethylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IA).

[f] GC-ECD (IIA) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.

[g] GC-ECD (IIB) on the 50 % octadecyl (C-18) methylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IIA).

[h] GC/MS (I) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

[i] GC/MS (II) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

[j] GC/MS (III) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IIA).

[k] Results from nineteen laboratories participating in an interlaboratory comparison exercise.

[l] The uncertainty interval for PCB 31 was widened in accordance with expert consideration of the analytical procedures, along with the analysis of the data as a whole, which suggests that the half-widths of the expanded uncertainties should not be less than 2 %.

Table 3. Certified Mass Fraction Values for Selected Chlorinated Pesticides in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Mass Fraction[a,b] (μg/kg)		
Hexachlorobenzene[e,f,g,h,i,j]	6.03	±	0.35
cis-Chlordane (α-Chlordane)[c,d,e,f,g,h,i,j]	16.51	±	0.83
trans-Nonachlor [c,d,e,f,g,h,i,j]	8.20	±	0.51

[a] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.
[b] Each certified value is a mean of the means from two or more analytical methods, weighted as described in Paule and Mandel [10].
Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO/JCGM Guide [11,12], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty within each analytical method as well as uncertainty due to the drying study. The expanded uncertainty defines a range of values within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of approximately 95 %.
[c] GC-ECD (IA) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.
[d] GC-ECD (IB) on the 50 % octadecyl (C-18) methylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IA).
[e] GC-ECD (IIA) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.
[f] GC-ECD (IIB) on the 50 % octadecyl (C-18) methylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IIA).
[g] GC/MS (I) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.
[h] GC/MS (II) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.
[i] GC/MS (III) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IIA).
[j] Results from nineteen laboratories participating in an interlaboratory comparison exercise.

Table 4. Certified Mass Fraction Values for Selected Elements in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Degrees of Freedom	Mass Fractions[a,b] (%)		
Aluminum[c,d,e]	4	5.33	±	0.49
Iron[c,d,e]	6	3.53	±	0.16
		Mass Fractions[a,b] (mg/kg)		
Arsenic[c,d,e,f,g]	10	18.9	±	2.8
Cadmium[c,f,,h,i]	6	8.8	±	1.4
Chromium[c,d,f,g,i]	9	266	±	24
Lead[c,h,i]	5	330	±	48
Manganese[c,d,e]	8	505	±	25
Nickel[c,g,h,i]	6	76.1	±	5.6
Zinc[c,d,e,g,i]	9	656	±	75

[a] The certified value is the mean of four results: (1) the mean of NIST INAA or ID-ICPMS analyses, (2) the mean of two methods performed at NRCC, and (3) the mean of results from seven selected laboratories participating in the NRCC intercomparison exercise, and (4) the mean results from INAA analyses at IAEA. The expanded uncertainty in the certified value is equal to $U = ku_c$ where u_c is the combined standard uncertainty and k is the coverage factor, both calculated according to the ISO/JCGM Guide [11,12]. The value of u_c is intended to represent at the level of one standard deviation the combined effect of all the uncertainties in the certified value. Here u_c accounts for both possible method biases, within-method variation, and material inhomogeneity. The coverage factor, *k*, is the Student's t-value for a 95 % confidence interval with the corresponding degrees of freedom. Because of the material inhomogeneity, the variability among the measurements of multiple samples can be expected to be greater than that due to measurement variability alone.
[b] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.
[c] Results from five to seven laboratories participating in the NRCC interlaboratory comparison exercise.
[d] Measured at NIST using INAA.
[e] Measured at NRCC using ICPOES.
[f] Measured at NRCC using GFAAS.
[g] Measured at IAEA using INAA.
[h] Measured at NIST using ID-ICPMS.
[i] Measured at NRCC using ID-ICPMS.

The measurands for reference values are indicated in Tables 5-11, 14, 16-17; as determined by the indicated methods indicated in the text. Metrological traceability is to the SI derived units for mass fraction, expressed as milligrams per kilogram, micrograms per kilogram or percentage, respectively.

Table 5. Reference Mass Fraction Values for Selected PAHs in SRM 1944

	Mass Fractions[a] (mg/kg)		
Naphthalene[b]	1.28	±	0.04[c]
1-Methylnaphthalene[b]	0.47	±	0.02[c]
2-Methylnaphthalene[b]	0.74	±	0.06[c]
Biphenyl[b]	0.25	±	0.02[c]
Acenaphthene[b]	0.39	±	0.03[c]
Fluorene[b]	0.48	±	0.04[c]
Dibenzothiophene[b]	0.50	±	0.03[c]
Anthracene[b]	1.13	±	0.07[c]
1-Methylphenanthrene[d,e,f,g]	1.7	±	0.1[h]
2-Methylphenanthrene[d,e,f,g]	1.90	±	0.06[h]
3-Methylphenanthrene[d,e,f,g]	2.1	±	0.1[h]
4-Methylphenanthrene and 9-Methylphenanthrene[d,e,f,g]	1.6	±	0.2[h]
2-Methylanthracene[d,e,f,g]	0.58	±	0.04[h]
3,5-Dimethylphenanthrene[d]	1.31	±	0.04[h]
2,6-Dimethylphenanthrene[d]	0.79	±	0.02[h,i]
2,7-Dimethylphenanthrene[d]	0.67	±	0.02[h,i]
3,9-Dimethylphenanthrene[d]	2.42	±	0.05[h,i]
1,6-, 2,9-, and 2,5-Dimethylphenanthrene[d]	1.67	±	0.03[h,i]
1,7-Dimethylphenanthrene[d]	0.62	±	0.02[h,i]
1,9- and 4,9-Dimethylphenanthrene[d]	1.20	±	0.03[h,i]
1,8-Dimethylphenanthrene[d]	0.24	±	0.01[h,i]
1,2-Dimethylphenanthrene[d]	0.28	±	0.01[h,i]
8-Methylfluoranthene[d]	0.86	±	0.02[h,i]
7-Methylfluoranthene[d]	0.69	±	0.02[h]
1-Methylfluoranthene[b]	0.39	±	0.01[c]
3-Methylfluoranthene[b]	0.56	±	0.02[c]
2-Methylpyrene[d]	1.81	±	0.04[h,i]
4-Methylpyrene[d]	1.44	±	0.03[h,i]
1-Methylpyrene[d]	1.29	±	0.03[h]
Anthanthrene[j]	0.9	±	0.1[h]

[a] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.
[b] GC/MS (VI) on proprietary non-polar methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.
[c] Reference values are the means of results obtained by NIST using one analytical technique. The expanded uncertainty, U, is calculated as $U = ku_c$, where u_c is one standard deviation of the analyte mean, and the coverage factor, k, is determined from the Student's t-distribution corresponding to the associated degrees of freedom (df = 2) and 95 % confidence level for each analyte.
[d] GC/MS (I) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.
[e] GC/MS (II) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.
[f] GC/MS (III) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.
[g] GC/MS (IV) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE with 50 % hexane/50 % acetone mixture.
[h] The reference value for each analyte is the equally-weighted mean of the means from two or more analytical methods or the mean from one analytical technique. The uncertainty in the reference value defines a range of values that is intended to function as an interval that contains the true value at a level of confidence of 95 %. This uncertainty includes sources of uncertainty within each analytical method, among methods, and from the drying study.
(i) The uncertainty interval for this compound was widened in accordance with expert consideration of the analytical procedures, along with the analysis of the data as a whole, which suggests that the half-widths of the expanded uncertainties should not be less than 2 %.
[j] LC-FL of isomeric PAH fractions after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

Table 6. Reference Mass Fractions for Selected PAHs of
Relative Molecular Mass 300 and 302 in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Mass Fraction[a,b,c] (mg/kg)		
Coronene	0.53	±	0.04
Dibenzo[*b*,*e*]fluoranthene	0.076	±	0.008
Naphtho[1,2-*b*]fluoranthene	0.70	±	0.06
Naphtho[1,2-*k*]fluoranthene and Naphtho[2,3-*j*]fluoranthene	0.66	±	0.05
Naphtho[2,3-*b*]fluoranthene	0.21	±	0.01
Dibenzo[*b*,*k*]fluoranthene	0.75	±	0.06
Dibenzo[*a*,*k*]fluoranthene	0.22	±	0.02
Dibenzo[*j*,*l*]fluoranthene	0.56	±	0.03
Dibenzo[*a*,*l*]pyrene	0.12	±	0.02
Naphtho[2,3-*k*]fluoranthene	0.11	±	0.01
Naphtho[2,3-*e*]pyrene	0.33	±	0.02
Dibenzo[*a*,*e*]pyrene	0.67	±	0.05
Naphtho[2,1-*a*]pyrene	0.76	±	0.05
Dibenzo[*e*,*l*]pyrene	0.28	±	0.02
Naphtho[2,3-*a*]pyrene	0.23	±	0.01
Benzo[*b*]perylene	0.43	±	0.04
Dibenzo[*a*,*i*]pyrene	0.30	±	0.03
Dibenzo[*a*,*h*]pyrene	0.11	±	0.01

[a] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.

[b] Reference values are the means of results obtained by NIST using one analytical technique. The expanded uncertainty, U, is calculated as $U = ku_c$, where u_c is one standard deviation of the analyte mean, and the coverage factor, k, is determined from the Student's t-distribution corresponding to the associated degrees of freedom (df = 2) and 95 % confidence level for each analyte.

[c] GC/MS on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE with DCM.

Table 7. Reference Mass Fractions for Selected PCB Congeners[a] and Chlorinated Pesticides in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Mass Fraction[b] (µg/kg)
PCB 45 (2,2',3,6-Tetrachlorobiphenyl)[c]	10.8 ± 1.4[d]
PCB 146 (2,2',3,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl)[c]	10.1 ± 1.9[d]
PCB 163 (2,3,3',4',5,6-Hexachlorobiphenyl)[c]	14.4 ± 2.0[d]
PCB 174 (2,2',3,3',4,5,6'-Heptachlorobiphenyl)[c]	16.0 ± 0.6[d]
α-HCH[f,g,h,i]	2.0 ± 0.3[e]
trans-Chlordane (γ-Chlordane)[c]	19.0 ± 1.7[d]
cis-Nonachlor[g,h,i,l,m]	3.7 ± 0.7[e]
2,4'-DDE[f,g,h,i,j,k,l,m]	19 ± 3[e]
2,4'-DDD[h,j,k,l,m]	38 ± 8[e]
4,4'-DDE[f,g,h,ihj,k,l,m]	86 ± 12[e]
4,4'-DDD [f,g,h,I,j,k,l,m]	108 ± 16[e]
4,4'-DDT[c]	170 ± 32[d]

[a] PCB congeners are numbered according to the scheme proposed by Ballschmiter and Zell [13] and later revised by Schulte and Malisch [3] to conform with IUPAC rules; for the specific congeners mentioned in this SRM, the Ballschmiter-Zell numbers correspond to those of Schulte and Malisch.

[b] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.

[c] NIST participation in the 2007 interlaboratory study using GC/MS.

[d] Reference values are the means of results obtained by NIST using one analytical technique. The expanded uncertainty, U, is calculated as $U = ku_c$, where u_c is one standard deviation of the analyte mean, and the coverage factor, k, is determined from the Student's t-distribution corresponding to the associated degrees of freedom (df = 2) and 95 % confidence level for each analyte.

[e] The reference value for each analyte is the equally-weighted mean of the means from two or more analytical methods or he mean from one analytical technique. The uncertainty in the reference value defines a range of values that is intended to function as an interval that contains the true value at a level of confidence of 95 %. This uncertainty includes sources of uncertainty within each analytical method, among methods, and from the drying study.

[f] GC-ECD (IA) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.

[g] GC-ECD (IB) on the 50 % octadecyl (C-18) methylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IA).

[h] GC-ECD (IIA) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with DCM.

[i] GC-ECD (IIB) on the 50 % octadecyl (C-18) methylpolysiloxane phase; same extracts analyzed as in GC-ECD (IIA).

[j] GC/MS (I) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after Soxhlet extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

[k] GC/MS (II) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE extraction with 50 % hexane/50 % acetone mixture.

[l] GC/MS (III) on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase; same extracts anlayzed as in GC-ECD (IIA).

[m] Results from nineteen laboratories participating in an interlaboratory comparison exercise.

Table 8. Reference Mass Fraction Values for Selected PBDEs in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Mass Fractions[a] (µg/kg)
PBDE 47 (2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether)[c,d,e,f]	1.72 ± 0.28[b]
PBDE 99 (2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether)[c,d,f]	1.98 ± 0.26[b]
PBDE 100 (2,2',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether)[c,d]	0.447 ± 0.027[b]
PBDE 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl ether)[c,d,e,f]	6.44 ± 0.37[b]
PBDE 154 (2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether)[c,d,f]	1.06 ± 0.08[b]
PBDE 183 (2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodiphenyl ether)[c,d,e,f]	31.8 ± 0.1[b]
PBDE 206 (2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonabromodiphenyl ether)[d,e]	6.2 ± 1.0[b]
PBDE 209 (Decabromodiphenyl ether) [c,d,e,f]	93.5 ± 4.4[b]

[a] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.
[b] Reference values are weighted means of the results from two to four analytical methods [14]. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean, with coverage factor 2 (approximately 95 % confidence), calculated by combining a between-method variance incorporating inter-method bias with a pooled within-source variance following the ISO/JCGM/NIST Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements [11,12].
[c] Results from ten laboratories participating in an interlaboratory study for PBDEs in sediment [12].
[d] Results from four laboratories participating in the 2007 interlaboratory study [13].
[e] NIST participation in the 2007 interlaboratory study using GC/MS.
[f] Data set from NIST for PBDEs using GC/MS following PFE with alumina SPE and SEC clean-up.

Table 9. Reference Mass Fraction Values for Selected Elements in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Degrees of Freedom	Mass Fraction[a,b] (%)
Silicon[c,d]	81	31 ± 3
		Mass Fraction[a,b] (mg/kg)
Antimony[c,e,f,g]	18	4.6 ± 0.9
Beryllium[c,h]	17	1.6 ± 0.3
Copper[c,d,f]	101	380 ± 40
Mercury[c,i]	18	3.4 ± 0.5
Selenium[c,e,f]	24	1.4 ± 0.2
Silver[c,d,e,g]	8	6.4 ± 1.7
Thallium[c,f]	12	0.59 ± 0.1
Tin[c,f]	22	42 ± 6

[a] The reference value is the equally weighted mean of available results from: (1) NIST INAA analyses, (2) two methods performed at NRCC, (3) results from seven selected laboratories participating in the NRCC intercomparison exercise, and (4) results from INAA analyses at IAEA. The expanded uncertainty in the reference value is equal to $U = ku_c$ where u_c is the combined standard uncertainty and k is the coverage factor, both calculated according to the ISO/JCGM Guide [11,12]. The value of u_c is intended to represent at the level of one standard deviation the uncertainty in the value. Here u_c accounts for possible method differences, within-method variation, and material inhomogeneity. The coverage factor, k, is the Student's t-value for a 95 % confidence interval with the corresponding degrees of freedom. Because of material inhomogeneity, the variability among the measurements of multiple test portions can be expected to be greater than that due to measurement variability alone.
[b] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.
[c] Results from five to seven laboratories participating in the NRCC interlaboratory comparison exercise.
[d] Measured at NRCC using GFAAS.
[e] Measured at NIST using INAA.
[f] Measured at NRCC using ID-ICPMS.
[g] Measured at IAEA using INAA.
[h] Measured at NRCC using ICPOES.
[i] Measured at NRCC using cold vapor atomic absorption spectroscopy (CVAAS).

Table 10. Reference Mass Fraction Values for Elements in SRM 1944
as Determined by INAA (Dry-Mass Basis)

	Effective Degrees of Freedom	Mass Fraction[a,b] (%)		
Calcium	21	1.0	±	0.1
Chlorine	21	1.4	±	0.2
Potassium	21	1.6	±	0.2
Sodium	25	1.9	±	0.1
		Mass Fraction[a,b] (mg/kg)		
Bromine	10	86	±	10
Cesium	11	3.0	±	0.3
Cobalt	10	14	±	2
Rubidium	14	75	±	2
Scandium	37	10.2	±	0.2
Titanium	21	4300	±	300
Vanadium	21	100	±	9

[a] The reference value is based on the results from an INAA study. The associated uncertainty accounts for both random and systematic effects, but because only one method was used, the results should be used with caution. The expanded uncertainty in the reference value is equal to $U = ku_c$ where u_c is the combined standard uncertainty and k is the coverage factor, both calculated according to the ISO/JCGM Guide [11,12]. The value of u_c is intended to represent at the level of one standard deviation the uncertainty in the value. Here u_c accounts for possible method differences, within-method variation, and material inhomogeneity. The coverage factor, k, is the Student's t-value for a 95 % confidence interval with the corresponding degrees of freedom. Because of material inhomogeneity, the variability among the measurements of multiple test portions can be expected to be greater than that due to measurement variability alone.

[b] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.

Table 11. Reference Mass Fraction Values for
Selected Dibenzo-*p*-Dioxin and Dibenzofuran Congeners in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Mass Fraction[a,b] (µg/kg)		
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin	0.133	±	0.009
1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin	0.019	±	0.002
1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-*p*-dioxin	0.026	±	0.003
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-*p*-dioxin	0.056	±	0.006
1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-*p*-dioxin	0.053	±	0.007
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-*p*-dioxin	0.80	±	0.07
Octachlorodibenzo-*p*-dioxin	5.8	±	0.7
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran[c]	0.039	±	0.015[d]
1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran	0.045	±	0.007
2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran	0.045	±	0.004
1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran	0.22	±	0.03
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	0.09	±	0.01
2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	0.054	±	0.006[e]
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran	1.0	±	0.1
1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran	0.040	±	0.006[e]
Octachlorodibenzofuran	1.0	±	0.1
Total Toxic Equivalents (TEQ)[f]	0.25	±	0.01
Total Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins	0.25	±	0.05[e]
Total Pentachlorodibenzo-*p*-dioxins	0.19	±	0.06
Total Hexachlorodibenzo-*p*-dioxins	0.63	±	0.09
Total Heptachlorodibenzo-*p*-dioxins	1.8	±	0.2
Total Tetrachlorodibenzofurans	0.7	±	0.2
Total Pentachlorodibenzofurans	0.74	±	0.07
Total Hexachlorodibenzofurans	1.0	±	0.1
Total Heptachlorodibenzofurans	1.5	±	0.1
Total Dibenzo-*p*-dioxins[g]	8.7	±	0.9
Total Dibenzofurans[g]	5.0	±	0.5

[a] Each reference value is the mean of the results from up to fourteen laboratories participating in an interlaboratory exercise. The expanded uncertainty in the reference value is equal to $U = ku_c$ where u_c is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO/JCGM Guide [11,12] and k is the coverage factor. The value of u_c is intended to represent at the level of one standard deviation the combined effect of all the uncertainties in the reference value. Here u_c is the uncertainty in the mean arising from the variation among the laboratory results. The degrees of freedom is equal to the number of available results minus one (13 unless noted otherwise). The coverage factor, k, is the value from a Student's t-distribution for a 95 % confidence interval.

[b] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.

[c] Confirmation results using a 50 % cyanopropyl phenyl polysiloxane or 90 % *bis*-cyanopropyl 10 % cyanopropylphenyl polysiloxane phase columns.

[d] Degrees of freedom = 7 for this compound.

[e] Degrees of freedom = 12 for this compound.

[f] TEQ is the sum of the products of each of the 2,3,7,8-substituted congeners multiplied by their individual toxic equivalency factors (TEFs) recommended by the North Atlantic Treaty Organization (NATO) [15]. With regard to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran, the results of the confirmation column were used when available to calculate the TEQ.

[g] Total of tetra- through octachlorinated congeners.

The measurands for reference values are indicated in Tables 12-13; as determined by the methods indicated in the text. Metrological traceability is to the SI unit for length and the SI derived units of area and volume, expressed as micrometers, and square meters per cubic centimeters; respectively.

Table 12. Reference Values for Particle Size Characteristics for SRM 1944

Particle Measurement	Value[a]
Mean diameter (volume distribution, MV, μm)[b]	151.2 ± 0.4
Mean diameter (area distribution, μm)[c]	120.4 ± 0.1
Mean diameter (number distribution, μm)[d]	75.7 ± 0.3
Surface Area (m^2/cm^3)[e]	0.050 ± 0.013

[a] The reference value is the mean value of measurements from the analysis of test portions from four bottles. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO/JCGM Guide [11,12], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty. The expanded uncertainty defines a range of values for the reference value within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of 95 %.

[b] The mean diameter of the volume distribution represents the center of gravity of the distribution and compensates for scattering efficiency and refractive index. This parameter is strongly influenced by coarse particles.

[c] The mean diameter of the area distribution, calculated from the volume distribution with less weighting by the presence of coarse particles than MV.

[d] The mean diameter of the number distribution, calculated using the volume distribution weighted to small particles.

[e] Calculated specific surface area assuming solid, spherical particles. This is a computation and should not be interchanged with an adsorption method of surface area determination as this value does not reflect porosity or topographical characteristics.

Table 13. Percentage of the Volume That is Smaller Than the Indicated Size

Percentile	Particle Diameter[a] (μm)
95	296 ± 5
90	247 ± 2
80	201 ± 1
70	174 ± 1
60	152 ± 1
50[b]	135 ± 1
40	120 ± 1
30	106 ± 1
20	91 ± 1
10	74 ± 1

[a] The reference value for particle diameter is the mean value of measurements from the analysis of test portions from four bottles. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO/JCGM Guide [11,12], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty. The expanded uncertainty defines a range of values for the reference value within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of 95 %.

[b] Median diameter (50 % of the volume is less than 135 μm).

Table 14. Reference Values for Total Organic Carbon and Percent Extractable Mass in SRM 1944

	Mass Fraction (%)		
Total Organic Carbon (TOC)[a,b]	4.4	±	0.3
Extractable Mass[c,d]	1.15	±	0.04

[a] Mass fraction is reported on a dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.
[b] The reference value for total organic carbon is an equally weighted mean value from routine measurements made by three laboratories. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO/JCGM Guide [11,12], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty. The expanded uncertainty defines a range of values for the reference value within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of 95 %.
[c] Extractable mass as determined from Soxhlet extraction using DCM.
[d] The reference value for extractable mass is the mean value of six measurements. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO/JCGM Guide [11,12], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty. The expanded uncertainty defines a range of values for the reference value within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of 95 %.

Table 15. Information Mass Fraction Values for Selected Elements in SRM 1944 as Determined by INAA (Dry-Mass Basis)

	Mass Fraction[a] (%)
Magnesium[b]	1.0

	Mass Fraction[a] (mg/kg)
Cerium[b]	65
Europium[b]	1.3
Gold[b]	0.10
Lanthanum[b]	39
Thorium[b]	13
Uranium[b]	3.1

[a] Mass fraction is reported on a dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.
[b] Measured at IAEA using INAA

Table 16. Information Mass Fraction Values for
Selected Polychlorinated Naphthalenes in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

			Mass Fraction[a] (μg/kg)
PCN	19	(1,3,5-Trichloronaphthalene)	1.4
PCN	23	(1,4,5-Trichloronaphthalene)	2.4
PCN	42	(1,3,5,7-Tetrachloronaphthalene)	2.7
PCN	47	(1,4,6,7-Tetrachloronaphthalene)	3.5
PCN	52	(1,2,3,5,7-Pentachloronaphthalene)	2.5
	60	(1,2,4,6,7-Pentachloronaphthalene)	
PCN	50	(1,2,3,4,6-Pentachloronaphthalene)	1.0
PCN	66	(1,2,3,4,6,7-Hexachloronaphthalene)	0.63
	67	(1,2,3,5,6,7-Hexachloronaphthalene)	
PCN	69	(1,2,3,5,7,8-Hexachloronaphthalene)	1.6
PCN	73	(1,2,3,4,5,6,7-Heptachloronaphthalene)	0.51
PCN	75	(Octachloronaphthalene)	0.20

[a] Mass fractions reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture. Information values are the median of the results from six laboratories participating in an interlaboratory comparison exercise (Appendix D).

Table 17. Information Mass Fraction Values for Three HBCD Isomers in SRM 1944 (Dry-Mass Basis)

	Mass Fraction[a,b] (μg/kg)
alpha-HBCD[b]	2.2
beta-HBCD[b]	1.0
gamma-HBCD[b]	18

[a] The information value is the median of the results from three analytical methods.
[b] Mass fractions are reported on dry-mass basis; material as received contains approximately 1.3 % moisture.

Table 18. Analytical Methods Used for the Measurement of Elements in SRM 1944

Elements	Analytical Methods
Aluminum	FAAS, ICPOES, INAA, XRF
Antimony	GFAAS, HGAAS, ICP-MS, ID-ICPMS, INAA
Arsenic	GFAAS, HGAAS, ICPMS, INAA, XRF
Beryllium	GFAAS, ICP-AES, ICPMS
Bromine	INAA
Cadmium	FAAS, GFAAS, ICPMS, ID-ICPMS
Calcium	INAA
Cerium	INAA
Cesium	INAA
Chlorine	INAA
Chromium	FAAS, GFAAS, ICPMS, ID-ICPMS, INAA, XRF
Cobalt	INAA
Copper	FAAS, GFAAS, ICPOES, ICPMS, ID-ICPMS, XRF
Europium	INAA
Gold	INAA
Iron	FAAS, ICPOES, ICPMS, ID-ICPMS, INAA, XRF
Lanthanum	INAA
Lead	FAAS, GFAAS, ICPMS, ID-ICPMS, XRF
Magnesium	INAA
Manganese	FAAS, ICPOES, ICPMS, INAA, XRF
Mercury	CVAAS, ICPMS
Nickel	GFAAS, ICPOES, ICPMS, ID-ICPMS, INAA, XRF
Potassium	INAA
Rubidium	INAA
Scandium	INAA
Selenium	GFAAS, HGAAS, ICPMS, INAA
Silicon	FAAS, ICPOES, XRF
Silver	FAAS, GFAAS, ICPMS, INAA
Sodium	INAA
Thallium	GFAAS, ICPOES, ICPMS, ID-ICPMS,
Thorium	INAA
Tin	GFAAS, ICPMS, ID-ICPMS
Titanium	INAA
Uranium	INAA
Vanadium	INAA
Zinc	FAAS, ICPOES, ICPMS, ID-ICPMS, XRF, INAA

Methods

CVAAS	Cold vapor atomic absorption spectrometry
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrometry
HGAAS	Hydride generation atomic absorption spectrometry
ICPOES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
ICPMS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
ID-ICPMS	Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry
INAA	Instrumental neutron activation analysis
XRF	X-ray fluorescence spectrometry

REFERENCES

[1] May, W.; Parris, R.; Beck, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definitions of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136, U.S. Government Printing Office: Gaithersburg, MD (2000); available at https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/srm/SP260-136.PDF (accessed Feb 2017)

[2] Wise, S.A.; Poster, D.L.; Schantz, M.M.; Kucklick, J.R.; Sander, L.C.; Lopez de Alda, M.; Schubert, P.; Parris, R.M.; Porter, B.J.; *Two New Marine Sediment Standard Reference Materials (SRMs) for the Determination of Organic Contaminants;* Anal. Bioanal. Chem., Vol. 378, pp. 1251-1264 (2004).

[3] Schulte E.; Malisch, R.; *Calculation of the Real PCB Content in Environmental Samples. I. Investigation of the Composition of Two Technical PCB Mixtures;* Fresenius Z. Anal. Chem., Vol. 314, pp. 545-551 (1983).

[4] Parris, R.M.; Schantz, M.M.; Wise, S.A.; *NIST/NOAA NS&T/EPA EMAP Intercomparison Exercise Program for Organic Contaminants in the Marine Environment: Description and Results of 1995 Organic Intercomparison Exercises*; NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 104, Silver Spring, MD (1996).

[5] Stapleton, H.M.; Keller, J.M.; Schantz, M.M.; Kucklick, J.R.; Wise, S.A.; *NIST Inter-Comparison Exercise Program for Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Marine Sediment: Description and Results of the 2004 Inter-Comparison Exercise*; NISTIR 7278 (2005).

[6] Schantz, M.M.; Parris, R.M.; Wise, S.A.; *NIST Intercomparison Exercise Program for Organic Contaminants in the Marine Environment: Description and Results of the 2007 Organic Intercomparison Exercises*; NISTIR 7501 (2008).

[7] Willie, S; Berman, S.; *NOAA National Status and Trends Program Tenth Round Intercomparison Exercise Results for Trace Metals in Marine Sediments and Biological Tissue;* NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 106, Silver Spring, MD (1996).

[8] Beary, E.S.; Paulson, P.J.; *Selective Application of Chemical Separations to Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Analysis of Standard Reference Materials;* Anal. Chem., Vol. 65, pp. 1602-1608 (1993).

[9] Greenberg, R.R.; Flemming, R.F.; Zeisler, R.; *High Sensitivity Neutron Activation Analysis of Environmental and Biological Standard Reference Materials;* Environ. Intern., Vol. 10, pp. 129-136 (1984).

[10] Paule, R.C.; Mandel, J.; *Consensus Values and Weighting Factors;* J. Res. Nat. Bur. Stand., Vol. 87 pp. 377-385 (1982).

[11] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data — Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM 1995 with Minor Corrections); Joint Committee for Guides in Metrology (2008); available at http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accessed Feb 2017); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/pml/pubs/tn1297/tn1297s.pdf (accessed Feb 2017).

[12] JCGM 101:2008; *Evaluation of measurement data – Supplement 1 to the Guide to Expression of Uncertainty in Measurement*; Propagation of Distributions Using a Monte Carlo Method; Joint Committee for Guides in Metrology (BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML), International Bureau of Weights and Measures (BIPM), Sèvres, France (2008); available at http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf (accessed Feb 2017).

[13] Ballschmiter, K.;Zell, M.; *Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCB) by Glass Capillary Gas Chromatography - Composition of Technical Aroclor- and Clophen-PCB Mixtures;* Fresenius Z. Anal. Chem,.Vol 302, pp. 20-31 (1980).

[14] Ruhkin, A.L.;Vangel, M.G. *Estimation of a Common Mean and Weighted Means Statistics;* J. Am. Statist. Assoc., Vol. 93, pp. 303-308 (1998).

[15] *International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) Method of Risk Assessment for Complex Mixtures of Dioxins and Related Compounds*, North Atlantic Treaty Organization Committee on Challenges in the Modern Society, Report No. 176, North Atlantic Treaty Organization (NATO), Brussels, Belgium (1988).

Certificate Revision History: 17 February 2017 (Change of expiration date; editorial changes); **27 September 2011** (Addition of mass fraction values for PBDE and PCN congeners; change of mass fraction reference values; editorial changes); **22 December 2008** (Extension of certification period); **14 May 1999** (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the Certificate of Analysis in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at http://www.nist.gov/srm.

APPENDIX A

The analysts and laboratories listed below participated in the interlaboratory comparison exercise for the determination of PBDEs in SRM 1944 [4].

D. Hoover and C. Hamilton, AXYS Analytical, Sidney, BC, Canada
S. Klosterhaus and J. Baker, Chesapeake Biological Laboratory, Solomons, MD, USA
S. Backus, Environment Canada, Ecosystem Health Division, Burlington, ON, Canada
E. Sverko, Environment Canada, Canada Centre for Inland Waters, Burlington, ON, Canada
P. Lepom, Federal Environmental Agency, Berlin, Germany
R. Hites and L. Zhu, Indiana University, Bloomington, IN, USA
G. Jiang, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Beijing, China
H. Takada, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan
A. Covaci and S. Vorspoels, University of Antwerp, Antwerp, Belgium
A. Li, Universtiy of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA

APPENDIX B

The analysts and laboratories listed below participated in the interlaboratory comparison exercise for the determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in SRM 1944.

W.J. Luksemburg, Alta Analytical Laboratory, Inc., El Dorado Hills, CA, USA
L. Phillips, AXYS Analytical Services Ltd., Sidney, British Columbia, Canada
M.J. Armbruster, Battelle Columbus Laboratories, Columbus, OH, USA
G. Reuel, Canviro Analytical Laboratories Ltd., Waterloo, Ontario, Canada
C. Brochu, Environment Québec, Laval, Québec, Canada
G. Poole, Environment Canada Environmental Technology Centre, Ottawa, Ontario, Canada
B. Henkelmann, GSF National Research Center for Environment and Health, Neuherberg, Germany
R. Anderson, Institute of Environmental Chemistry, Umeå University, Umeå, Sweden
C. Lastoria, Maxxam Analytics Inc., Mississauga, Ontario, Canada
E. Reiner, Ontario Ministry of Environment and Energy, Etobicoke, Ontario, Canada
J. Macaulay, Research and Productivity Council, Fredericton, New Brunswick, Canada
T.L. Wade, Texas A&M University, College Station, TX, USA
C. Tashiro, Wellington Laboratories, Guelph, Ontario, Canada
T.O. Tiernan, Wright State University, Dayton, OH, USA

APPENDIX C

The analysts and laboratories listed below participated in the interlaboratory comparison exercise for the determination of trace elements in SRM 1944.

A. Abbgy, Applied Marine Research Laboratory, Old Dominion University, Norfolk, VA, USA
A. Scott, Australian Government Analytical Laboratories, Pymble, Australia
H. Mawhinney, Animal Research Institute, Queensland Department of Primary Industries, Queensland, Australia
E. Crecelius, Battelle Pacific Northwest, Sequim, WA, USA
M. Stephenson, California Department of Fish and Game, Moss Landing, CA, USA
B. Presley, Department of Oceanography, Texas A&M University, College Station, TX, USA
K. Elrick, U.S. Geological Survey, Atlanta, GA, USA

APPENDIX D

The analysts and laboratories listed below participated in the interlaboratory comparison exercise for the determination of polychlorinated naphthalenes in SRM 1944.

J. Kucklick, National Institute of Standards and Technology, Charleston, SC, USA
E. Sverko, Environment Canada, Canada Centre for Inland Waters, Burlington, ON, Canada
P. Helm, Ontario Ministry of the Environment, Etobicoke, ON, Canada
N. Yamashita, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan
T. Harner, Environment Canada, Meteorological Service of Canada, Toronto, ON, Canada
R. Lega, Ontario Ministry of the Environment, Etobicoke, ON, Canada

EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Reference Materials and Measurements

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL
BCR® – 481

CERTIFICATE OF ANALYSIS

INDUSTRIAL SOIL				
IUPAC Code		Mass fraction based on dry mass		Number of accepted sets of data p
		Certified value [1] [mg/kg]	Uncertainty [2] [mg/kg]	
PCB 101	2,2',4,5,5' Pentachlorobiphenyl	37	3	18
PCB 118	2,3',4,4',5 Pentachlorobiphenyl	9.4	0.7	15
PCB 128	2,2',3,3',4,4' Hexachlorobiphenyl	9.1	0.8	7
PCB 149	2,2',3,4',5',6 Hexachlorobiphenyl	97	7	11
PCB 153	2,2',4,4',5,5' Hexachlorobiphenyl	137	7	18
PCB 156	2,3,3',4,4',5 Hexachlorobiphenyl	7.0	0.5	14
PCB 170	2,2',3,3',4,4',5 Heptachlorobiphenyl	52	4	12
PCB 180	2,2',3,4,4',5,5' Heptachlorobiphenyl	124	6	17

1) Unweighted mean value of the means of p accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The value is traceable to the International System of Units (SI).

2) The uncertainty is taken as the half-width of the 95 % confidence interval of the mean given in [1].

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 200 mg.

NOTE

This material has been certified by BCR (Community Bureau of Reference, the former reference materials programme of the European Commission). The certificate has been revised under the responsibility of IRMM.

Brussels, December 1994
Revised: November 2007

Signed: _____

Prof. Dr. Hendrik Emons
Unit for Reference Materials
EC-JRC-IRMM
Retieseweg 111
2440 Geel, Belgium

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The sample consists of approximately 25 g of industrial soil in brown glass bottles with a polyethene insert. Additional information on the presence of chlorobiphenyls other than those tabulated is given in the report.

ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

Calibration was done with solutions of BCR-CRM's (291, 293-298) or from compounds of verified purity and stoichiometry (PCB 128, 149, 156 and 170). The samples were extracted with a mixture of hexane and acetone, pentane and dichloromethane, or by pentane, ethyl acetate or by CO_2 supercritical fluid extraction with methanol as modifier. Eventual clean-up was carried out by sulphuric acid and/or column chromatography (on alumina, silica or florisil) or high performance liquid chromatography. Capillary gas chromatography with electron capture detection or mass-spectrometry was performed using different injection systems, different columns including multidimensional GC and different temperature programmes.

PARTICIPANTS

Agricultural Research Center, Jokionen (F)I
Bureau de Recherche Géologique et Minière (BRGM), Orléans (FR)
CEC, Joint Research Centre, Environment Institute, Ispra (IT)
ELF - ATOCHEM, Levallois (FR)
Institut du Génie de l'Environnement - Ecole Polytechnique, Lausanne (CH)
Institute for Environmental Studies, Free University of Amsterdam, Amsterdam (NL)
Instituto Quimico de Sarria, Barcelona (ES)
IRH - Génie de l'Environnement, Vandoeuvre (FR)
Laboratoire Cantonal, Genève (CH)
Laboratoire Fédéral d'Essai des Matériaux et de Recherche (EMPA), Dübendorf (CH)
Laboratoire Municipal et Régional, Rouen (FR)
National Swedish Environmental Protection Board, Solna (SE)
Netherlands Institute for Fishery Investigations, Ijmuiden (NL)
SGS - Depauw & Stockoe, Antwerpen (BE)
Universita de Barcelona, Barcelona (ES)
University of Amsterdam, Amsterdam (NL)
Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO), Mol (BE)

SAFETY INFORMATION

The usual laboratory safety precautions apply.

INSTRUCTIONS FOR USE

The material is intended for quality control purposes, verification or validation of an analyticical procedure. The material is not intended for use as a calibrant.
The results of the certification measurements were corrected for the water content which was determined by heating of aliquot (about 1 g) of soil at 105 °C until constant mass. The water content ranged from 1.2 to 3 % (mass fraction).

STORAGE

Storage should take place at 18 °C.
However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of opened samples.

LEGAL NOTICE

Neither IRMM, its subsidiaries, its contractors nor any person acting on their behalf,
(a) make any warranty or representation, express or implied that the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document does not infringe any privately owned intellectual property rights; or
(b) assume any liability with respect to, or for damages resulting from, the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document save for loss or damage arising solely and directly from the negligence of IRMM or any of its subsidiaries.

NOTE

A technical report on the production of BCR®–481 is available on the internet (http://www.irmm.jrc.be). A paper copy can be obtained from IRMM on request.

European Commission – Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg 111, B - 2440 Geel (Belgium)
Telephone: +32-(0)14-571.722 - Telefax: +32-(0)14-590.406

EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE

Institute for Reference Materials and Measurements (Geel)

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL
BCR®-529

CERTIFICATE OF ANALYSIS

INDUSTRIAL SOIL (sandy soil)			
	Mass fraction based on dry mass		
Chlorophenols	Certified value [1] [mg/kg]	Uncertainty [2] [mg/kg]	Number of accepted sets of results p
3,4-dichlorophenol	0.23	0.04	7
2,4,5-trichlorophenol	1.51	0.10	7
Pentachlorophenol	0.23	0.04	8
Polychlorodibenzo-p-dioxins and polychlorodibenzo-furans[3]	Certified value [1] [µg/kg]	Uncertainty [2] [µg/kg]	Number of accepted sets of results p
2,3,7,8-TCDD (D48)	4.5	0.6 [4]	12
1,2,3,7,8-PeCDD (D54)	0.44	0.05	6
1,2,3,4,7,8-HxCDD (D66)	1.22	0.21	9
1,2,3,6,7,8-HxCDD (D67)	5.4	0.9	11
1,2,3,7,8,9-HxCDD (D70)	3.0	0.4	12
2,3,7,8-TCDF (F83)	0.078	0.013	7
1,2,3,7,8-PeCDF (F94)	0.145	0.028	8
2,3,4,7,8-PeCDF (F114)	0.36	0.07	8
1,2,3,4,7,8-HxCDF (F118)	3.4	0.5	9
1,2,3,6,7,8-HxCDF (F121)	1.09	0.15	12
1,2,3,7,8,9-HxCDF (F124)	0.022	0.010	5
2,3,4,6,7,8-HxCDF (F130)	0.37	0.05	12

[1] This value is the unweighted mean of the means of p accepted sets of results. The certified value and its uncertainty are traceable to the International System of units (SI).
[2] The uncertainty is taken as the half-width of the 95 % confidence interval of the mean given in [1].
[3] Values as obtained by GC-MS.
[4] The uncertainty is adjusted for inhomogeneity.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 2 g.

Brussels, November 1998
Latest revision: February 2014

Signed: 

Prof. Dr. Hendrik Emons
European Commission
Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements
Retieseweg 111
B-2440 Geel, Belgium

NOTE

This material has been certified by BCR (Community Bureau of Reference, the former reference materials programme of the European Commission). The certificate has been revised under the responsibility of IRMM.

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The sample consists of approximately 50 g of industrial sandy soil in brown glass bottles with a polythene insert lined with aluminium. Information on the presence of additional organic chlorinated compounds other than those tabulated is given in the report.

ANALYTICAL METHODS USED FOR CERTIFICATION

Calibration was done with BCR-CRMs (PCDD/F) or compounds of verified purity and stoichiometry (CB and CP). The samples were extracted with one or a mixture of solvents and were cleaned-up before or after derivatisation (CP only). Separation and quantification was carried out by HPLC with amperometric detection (CP) or gas chromatography with ECD, MS or atomic emission detection.

PARTICIPANTS

- Bayer AG, ZF-DZA, Leverkusen (DE)
- Centre d'Analyse et de Recherche sur les Substances Organiques - CARSO, Vernaison (FR)
- Centro de Investigacion y Desarollo, CID-CSIC, Barcelona (ES)
- CNR, Istituto Inquinamento Atmosferico, Roma (IT)
- CSL Food Science Laboratory, Norwich (GB)
- EMPA, Dübendorf (CH)
- Institut Fresenius, Dortmund (DE)
- Institut Fresenius, Dresden (DE)
- Institut Fresenius, Hamburg (DE)
- Institut Fresenius, Ingelheim (DE)
- Institute of Occupational Health, Dept. of Occ. Hygiene and Toxicology, Helsinki (FIN)
- Institut Pasteur de Lille, Département Eau et Environnement, Lille (FR)
- Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, European Commission, Geel (BE)
- IRH, Génie de l'Environnement, Vandoeuvre (FR)
- Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano (IT)
- Miljoe-Kemie, Albertslund (DK)
- National Public Health Institute, Division of Environmental Health, Kuopio (FIN)
- RIVM, Laboratory of Organic Analytical Chemistry, Bilthoven (NL)
- RW-TÜV, Anlagetechnik GmbH, Essen (DE)
- Solvay Duphar B.V., Environmental Research Dept., Weesp (NL)
- Universidad de Santiago de Compostela, Dpto. Quimica Analitica, Santiago (ES)
- Universitat de Barcelona, Dpt. Quimica Analitica, Barcelona (ES)
- Universiteit van Amsterdam, MTC, Amsterdam (NL)
- University of Umea, Dept. of Environmental Chemistry, Umea (SE)
- VITO, Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek, Mol (BE)
- VTT Chemical Technology, Chemical Analysis, Espoo (FIN)
- ZENECA Specialities, Manchester (GB)

SAFETY INFORMATION

Toxic material. The material must be handled with great care, especially avoiding skin contamination, ingestion or inhalation.

INSTRUCTIONS FOR USE

For analysis the sample should be taken as it is.
Before a bottle is opened, it should be shaken manually for at least 5 minutes so that the material is re-homogenised.
Due to the pre-treatment of the soil its physico-chemical behaviour may differ from soil samples routinely measured. Therefore it may be necessary to re-constitute the reference material.
The water mass fraction of the soil is approximately 1.5 %. Thus any correction will fall well within the uncertainty of the analytical procedure. However it is recommended to verify the water content on a separate portion of the material on each occasion of the analysis, preferably by Karl Fischer titration.
The material is not intended for use as a calibrant.
For detailed information, please consult the certification report.

STORAGE

The samples should be stored in the dark at a constant temperature of + 4 °C.
However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of opened samples.

LEGAL NOTICE

Neither IRMM, its subsidiaries, its contractors nor any person acting on their behalf.
(a) make any warranty or representation, express or implied that the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document does not infringe any privately owned intellectual property rights;
or
(b) assume any liability with respect to, or for damages resulting from, the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document save for loss or damage arising solely and directly from the negligence of IRMM or any of its subsidiaries.

NOTE

A technical report on the production of BCR®-529 is available on the internet (http://www.irmm.jrc.be). A paper copy can be obtained from IRMM on request.

European Commission – Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg 111, 2440 Geel (Belgium)
Telephone: +32-(0)14-571.722 - Telefax: +32-(0)14-590.406

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM®- CC141

LOAM SOIL		
Total content	Mass fraction based on dry mass	
	Certified value [2] [mg/kg]	Uncertainty [3] [mg/kg]
As	9.9	1.5
Cd	0.35	0.05
Co	8.5	0.5
Cr	86	8
Cu	14.4	1.4
Hg	0.083	0.017
Mn	464	18
Ni	26.4	2.4
Pb	41	4
Zn	57	4
Aqua regia extractable content[1]	Mass fraction based on dry mass	
	Certified value [2] [mg/kg]	Uncertainty [3] [mg/kg]
As	7.5	1.4
Cd	0.25	0.04
Co	7.9	0.9
Cr	31	4
Cu	12.4	0.9
Hg	0.080	0.008
Mn	387	17
Ni	21.9	1.6
Pb	32.2	1.4
Zn	50	4

1) According to ISO 11466 (two laboratories deviated from the standard method by using microwave digestion)
2) Unweighted mean value of the means of accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The certified values are traceable to the SI.
3) The certified uncertainty is the expanded uncertainty with a coverage factor k = 2 corresponding to a level of confidence of about 95 % estimated in accordance with ISO/IEC Guide 98-3, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM:1995), ISO, 2008.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 100 mg for the total content and 3 g for aqua regia extractable content as prescribed by ISO 11466.

Accepted as an ERM®, Geel, August 2010
Latest revision: February 2012

Signed:

Prof. Dr. Hendrik Emons
European Commission
Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements
Retieseweg 111
B-2440 Geel, Belgium

NOTE

European Reference Material ERM®-CC141 was produced and certified under the responsibility of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials® co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet website (http://www.erm-crm.org).

Additional Material Information

Major components	Mass Fraction Value [g/kg]
SiO_2 [2)]	782.8
MgO [1)]	6.8
Al_2O_3 [1)]	167.0
TiO_2 [1)]	7.2
Fe_2O_3 [1)]	65.8
P_2O_5 [2)]	1.3
K_2O [1)]	42.2
Na_2O [1)]	21.7
CaO [1)]	6.2

[1)] Obtained by k_0-NAA
[2)] SiO_2 and P_2O_5 were determined by gravimetry and spectrophotometry, respectively

The total organic carbon is 0.99 % ± 0.03 % (mass fraction) and the total inorganic carbon is < 0.01 % (mass fraction), based on dry mass (measurements performed according to ISO 10694).
The water content as determined by volumetric Karl-Fischer titration is 1.3 % ± 0.2 % (mass fraction).
The water activity, determined using a water activity meter, is 0.201 ± 0.003.

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The material consists of minimum 24 g of a loam soil, provided in screw-capped amber glass bottles, packaged under argon and closed with polyethylene inserts.

USE OF THE CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

The main purpose of the material is to assess method performance, e.g. for checking accuracy of analytical results. As any reference material, it can also be used for control charts or validation studies.

ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

- Direct mercury analysis
- Cold vapour atomic absorption spectrometry
- Cold vapour atomic fluorescence spectrometry
- Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry
- Electrothermal atomic absorption spectrometry
- Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
- Inductively coupled plasma mass spectrometry
- k_0-neutron activation analysis

PARTICIPANTS

ALS Laboratory Group, ALS Czech Republic, Praha (CZ) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; CAI, 521*

ALS Laboratory Group, ALS Scandinavia AB, Luleå (SE) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; SWEDAC-1087*

BAM Federal Institute for Materials Research and Testing - Department of Analytical Chemistry – Reference Materials, Berlin, Germany (measurements under the scope of ISO/IEC 17025, DAP-PL-2614.14)

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Service Central d'Analyse, Solaize (FR)

DSM Research BV, Geleen (NL)

Energy Research Centre of the Netherlands (ECN), Petten (NL) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; RVA, L135*

European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel (BE) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; BELAC, 268-TEST*

Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), München (DE) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; DACH, DAC-PL-0141-01-10*

Institut "Jozef Stefan" (JSI), Department of Environmental Sciences, Ljubljana (SI) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; SA, LP-90*

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Environmental Metrology Service, Roma (IT) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; SIT nr. 211*

LGC Ltd., Teddington (UK) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; UKAS, 0003*

Minton Treharne & Daies Ltd (MTD), Herbert J Evans Division, Carmarthenshire (UK) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; UKAS, 0024*

Państwowy Instytut Geologiczny, (Polish Geoloical Institute), Warszawa, (PL) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; PCA, AB 283*

Studiecentrum voor Kernenergie, SCK, Mol (BE) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; BELAC, 015-TEST*

The Macaulay Institute, Analytical Service, Aberdeen (UK) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; UKAS, 1917*

Umweltbundesamt GmbH, Prüfstelle für Umwelt-, GVO- & Treibstoff-Analytik, Wien (AT) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation, BMWA-92.714/0518-I*

Universidad de Barcelona, Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Barcelona (ES)

University of Ferrara, Department of Chemistry, Ferrara (IT)

Universidad de Santiago, Facultad de Quimica, Departamento de Quimica Analitica, Santiago de Compostela (ES)

Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO), Mol (BE) - *Measurements performed under ISO/IEC 17025 accreditation; BELAC, 045-TEST*

INSTRUCTIONS FOR USE

The bottles shall be shaken for at least two minutes before opening to ensure re-homogenisation of the content.
The correction to dry mass shall be determined on a separate portion taken at the same time of the analysis from the same bottle. It shall be carried out by drying at least 1 g of the sub-sample in an oven at +105 °C ± 2 °C until constant weight is achieved.

STORAGE

Samples should be stored at +18 °C ± 5 °C, in the dark. The material picks up moisture when in prolonged contact with humid air. Spoilage by moulds may occur at water contents exceeding 8 % (mass percent) and damage the whole sample. Care should be taken to avoid moisture pick up once the bottles are opened.
The European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of opened samples.

SAFETY INFORMATION

The usual laboratory safety precautions apply.

LEGAL NOTICE

Neither the European Commission, its contractors nor any person acting on their behalf:
(a) make any warranty or representation, express or implied, that the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document does not infringe any privately owned intellectual property rights; or
(b) assume any liability with respect to, or for damages resulting from the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document save for loss or damage arising solely and directly from the negligence of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre.

NOTE

A detailed technical report is available on www.erm-crm.org. A paper copy can be obtained from the Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements on request.

European Commission – Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg 111, B - 2440 Geel (Belgium)
Telephone: +32-(0)14-571.722 - Fax: +32-(0)14-590.40

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM®- CD281

RYE GRASS		
	Mass Fraction	
	Certified value [1] [mg/kg]	Uncertainty [2] [mg/kg]
As	0.042	0.010
B	5.5	0.5
Cd	0.120	0.007
Cr	24.8	1.3
Cu	10.2	0.5
Hg	0.0164	0.0022
Mn	82	4
Mo	2.22	0.12
Ni	15.2	0.6
Pb	1.67	0.11
Sb	0.042	0.007
Se	0.023	0.004
Sn	0.062	0.011
Zn	30.5	1.1

1) The value is the unweighted mean of accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method. The certified values are reported on dry mass basis and are traceable to the SI.

2) Expanded uncertainty with a coverage factor k = 2 according to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 200 mg.

Accepted as an ERM®, Geel, May 2010

Signed:

Prof. Dr. Hendrik Emons
European Commission
Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements
Retieseweg 111
B-2440 Geel, Belgium

NOTE

European Reference Material ERM®-CD281 was produced and certified under the responsibility of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials® co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (http://www.erm-crm.org).

Additional Material Information

	Mass fraction
	Value[1)] [g/kg]
Ca	6.3
Fe	0.18
K	34
Mg	1.6
Na	4.0
P	2.8
S	3.4
Si	1.3

1) As obtained by quantitative screening analysis using ICP-MS in one laboratory and reported based on dry mass.

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The material consists of about 10 g of dried and ground rye grass packed into an amber glass vial under argon atmosphere.

ANALYTICAL METHODS USED FOR CERTIFICATION

- atomic absorption spectrometry
- atomic fluorescence spectrometry
- direct mercury analyzer
- inductively coupled plasma mass spectrometry
- inductively coupled plasma optical emission spectrometry
- isotope dilution inductively coupled plasma optical emission spectrometry
- neutron activation analysis

PARTICIPANTS

ALS Scandinavia AB, Luleå (SE)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in environmental matrices and food, SWEDAC No 1087)

Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin (DE)
(accredited to ISO/IEC 17025 for measurement of trace elements in foodstuffs, DAP-PL-2614.14)

DSM Resolve, Geleen (NL)

Energieonderzoek Centrum Nederland (ECN), Petten (NL)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in plants, sediment and ash, RVA No L135)

European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel (BE)
(accredited to ISO Guide 34 for production of certified reference materials, BELAC No 268-TEST)

Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Neuherberg (DE)

Institut "Jozef Stefan" (JIS), Ljubljana (SI)

Laboratoire National de métrologie d'Essais (LNE), Paris (FR)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in food and sediments, COFRAC No 2-54)

LGC Limited, Teddington – Middlesex (GB)
(accredited to ISO 17025/IEC for measurement of trace elements in food, inorganic and organic matrices, UKAS No 0003)

Minton, Treharne & Davis Limited, Carmarthenshire (GB)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in environmental matrices and food, UKAS No 1946)

MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen (FI)
(accredited to ISO/IEC 17025 for measurement of elements in food and feed, FINAS T024)

Studiecentrum voor Kernenergie - Centre d'Etude de l'énergie Nucléaire (SCK-CEN), Mol (BE)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in animal feed, sediment and soils using k_0-NAA, BELAC No 015-TEST)

The Food and Environment Research Agency (FERA), York (GB)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in animal feed and soils, UKAS No 1642)

Umweltbundesamt Wien (UBA Wien) , Wien (AT)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in plants and sewage sludge, BMWA No -92.714/0518-I/12/2007)

Universidad de Santiago, Facultad de Quimica, Departamento de Quimica Analitica, Nutricion y Bromatologia, Santiago de Compostela (ES)

VA SYD, Malmö (SE)
(accredited to ISO/IEC 17025 for element determination in sewage sludge and sediments, SWEDAC No 2011)

Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO), Mol (BE)
(accredited to ISO/IEC 17025 for measurement of elements in soils, BELAC No 045-TEST)

SAFETY INFORMATION

The usual laboratory safety precautions apply.

INSTRUCTIONS FOR USE

This material is intended to be used for method performance assessment i.e. for checking accuracy of analytical results. As any reference material, it can also be used for control charts or validation studies.

The vials shall be shaken by turning upside down for at least 2 min before opening to ensure material re-homogenisation.

Dry mass determination shall be carried out on a separate portion of at least 1 g, by drying in an oven at 105 °C ± 2 °C until constant mass (separate weighings should not differ by more than 5 mg) is attained. Weighing of the samples for dry mass determination and weighing for the analysis shall be done at the same time to avoid differences due to possible take up of moisture by the material.

STORAGE

The materials shall be stored at 18 °C ± 5 °C and in the dark. Care shall be taken to avoid moisture pickup once the vials are open. However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of open samples.

LEGAL NOTICE

Neither the European Commission, its contractors nor any person acting on their behalf:

(a) make any warranty or representation, express or implied, that the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document does not infringe any privately owned intellectual property rights; or

(b) assume any liability with respect to, or for damages resulting from, the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document save for loss or damage arising solely and directly from the negligence of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Joint Research Centre.

NOTE

A detailed technical report is available on www.erm-crm.org. A paper copy can be obtained from the Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements on request.

European Commission – Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg 111, B - 2440 Geel (Belgium)
Telephone: +32-(0)14-571.722 - Fax: +32-(0)14-590.406

Allegato 6

INDAM LABORATORI CHIMICI SRL CASTELMELLA (BS)	**MODULO 023 A** **RIFERIMENTO PROCEDURA: PO 023**	PAG. 1 DI 1
	TITOLO **ELABORAZIONE DATI CIRCUITI INTERLABORATORIO**	REV. N° 1 DATA 08/08/14
	N° DI REGISTRAZIONE RPO 023 A	EMESSO DA ReS (SC)

GESTIONE DEI CIRCUITI INTERLABORATORIO FANGHI E TERRENI

XM = media dei valori di tutti i laboratori
r % = ripetibilità interlab
R % = riproducibilità interlab

ANALITA	METODO	TECNICA	DATA	IDENTIFICAZIONE CIRCUITO	NOTE	MEDIA INDAM	Sj INDAM	Xnom	XM	Z score	UNITA' DI MIS.	CVr%	CVR%
As	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	novembre-17	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	16,74	0,5933	14,581	14,4	1,11	µg/g		13,30
Cu	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	novembre-17	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	69,95	2,414	70,29	69,691	0,70	µg/g		4,00
Hg	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	novembre-17	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	2,39	0,0674	2,702	3,004	-1,12	µg/g		46,80
Pb	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	novembre-17	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	55,83	0,1123	54,1	54,007	0,69	µg/g		7,70
Zn	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	novembre-17	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	520,11	15,958	423,277	401,46	1,90	µg/g		22,50

ANALITA	METODO	TECNICA	ACCURATEZZA NEL CIRCUITO	ESTESA % (k=2)	INTERORWITZ RSDR%	CAMPIONE ARRIVA	SI PROGRAMMA	LISI ESEGUITA	JLTATI SPEDI	RAZIONI RICEVUTE IL
As	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	101%	13,2	11	09/06/2017	20/07/2017	20/07/2017	21/07/2017	02/11/2017
Cu	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	98%	21,2	9	09/06/2017	20/07/2017	20/07/2017	21/07/2017	02/11/2017
Hg	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	94%	27,2	15	09/06/2017	20/07/2017	20/07/2017	21/07/2017	02/11/2017
Pb	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	92%	23,2	9	09/06/2017	20/07/2017	20/07/2017	21/07/2017	02/11/2017
Zn	DM 13/09/1999 GU n° 248 21/10/1999 Met XI.1 SO n° 185 + EPA 200,8 1994	ICP-MS	101%	13,0	6	09/06/2017	20/07/2017	20/07/2017	21/07/2017	02/11/2017

INDAM LABORATORI CHIMICI SRL CASTELMELLA (BS)	**MODULO 023 A** **RIFERIMENTO PROCEDURA: PO 023**	PAG. 1 DI 1
	TITOLO **ELABORAZIONE DATI CIRCUITI INTERLABORATORIO**	REV. N° 1 DATA 08/08/14
	N° DI REGISTRAZIONE RPO 023 A	EMESSO DA ReS (SC)

Allegato 7

GESTIONE DEI CIRCUITI INTERLABORATORIO PCB

XM = media dei valori

ANALITA	METODO	ESTTRAZIONE	TECNICA	DATA	IDENTIFICAZIONE CIRCUITO	NOTE	MEDIA INDAM	Sj INDAM	Xnom	XM	Z score	XM MTD+TEC.	UNITA' DI MIS.	r%	R%
PCB #77	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	296,47	19,570	313,15	311,977	-0,41		pg/g		8
PCB #81	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	9,40	0,399		9,271	-0,93		pg/g		49,2
PCB #105	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	2046,47	26,676	2106,78	2151,38	-0,14		pg/g		17,5
PCB #114	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	95,34	4,236	111,41	115,405	-0,62		pg/g		22
PCB #118	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	6743,76	50,114	7190,98	7411,27	-0,36		pg/g		12,2
PCB #123	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	140,35	5,132		173,619	0,22		pg/g		74,9
PCB #126	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	34,44	1,445	37,07	35,97	-0,38		pg/g		11
PCB #156	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	1223,77	48,670	1242,74	1254,01	-0,07		pg/g		17,8
PCB #157	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	203,42	13,911	216,84	214,655	-0,28		pg/g		19,3
PCB #167	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	594,32	30,865	615,11	617,199	-0,18		pg/g		18,7
PCB #169	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	9,52	0,348		11,465	-1,69		pg/g		11,2
PCB #189	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	206,35	13,697	200,45	204,282	0,18		pg/g		17,6
TEQ (PCB)	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	4,0999	0,132	4,51	4,436	-0,60		pg/g		14,2
TEQ (PCB) Upperbound	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	4,0999	0,132	4,51	4,436	-0,60		pg/g		10,3
TEQ Total (PCDD/F+PCB)	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	54,0565	0,441	54,66	53,647	-0,11		pg/g		7,5
EQ Total (PCDD/F+PCB) Up	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	54,0565	0,441	54,78	53,707	-0,13		pg/g		7,4
PCB #28	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	4,80	0,086		4,389	0,83		ng/g		21,7
PCB #52	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	6,49	0,430		6,061	0,22		ng/g		25,6
PCB #101	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	10,58	0,522		10,262	-0,12		ng/g		20,5
PCB #138	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	10,81	0,007	13,31	11,799	-0,72		ng/g		20,3
PCB #153	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	16,18	0,226		15,483	-0,14		ng/g		23,7
PCB #180	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	12,07	2,472		11,451	0,64		ng/g		31,8
Total PCB ICES-6	EPA 1668	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	60,9300	1,838		61,1611	-0,04		ng/g		16,8

ANALITA	ACCURATEZZA SUL NOMINALE	ACCURATEZZA NEL CIRCUITO	INC ESTESA % (k=2) INTERLAB	HORWITZ RSDR%
PCB #77	95%	95%	**16**	19
PCB #81		101%	**98**	32
PCB #105	97%	95%	**35**	14
PCB #114	86%	83%	**44**	22
PCB #118	94%	91%	**24**	12
PCB #123		81%	**150**	21
PCB #126	93%	96%	**22**	26
PCB #156	98%	98%	**36**	15
PCB #157	94%	95%	**39**	20
PCB #167	97%	96%	**37**	17
PCB #169		83%	**22**	31
PCB #189	103%	101%	**35**	20
TEQ (PCB)	91%	92%	**28**	36
TEQ (PCB) Upperbound	91%	92%	**21**	36
TEQ Total (PCDD/F+PCB)	99%	101%	**15**	25
EQ Total (PCDD/F+PCB) Up	99%	101%	**15**	25
PCB #28		109%	**43**	36
PCB #52		107%	**51**	35
PCB #101		103%	**41**	32
PCB #138	81%	92%	**41**	31
PCB #153		105%	**47**	30
PCB #180		105%	**64**	31
Total PCB ICES-6		100%	**34**	24

CAMPIONE ARRIVATO IL	ANALISI PROGRAMMATA IL	ANALISI ESEGUITA IL	RISULTATI SPEDITI IL	ELABORAZIONI RICEVUTE IL
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017

Allegato 8

INDAM LABORATORI CHIMICI SRL CASTELMELLA (BS)	**MODULO 023 A** **RIFERIMENTO PROCEDURA: PO 023**	PAG. 1 DI 1
	TITOLO **ELABORAZIONE DATI CIRCUITI INTERLABORATORIO**	REV. N° 1 DATA 08/08/14
	N° DI REGISTRAZIONE RPO 023 A	EMESSO DA ReS (SC)

GESTIONE DEI CIRCUITI INTERLABORATORIO
DIOSSINE

XM = media dei valori

ANALITA	METODO	ESTRAZIONE	TECNICA	DATA	IDENTIFICAZIONE CIRCUITO	NOTE	MEDIA INDAM	Sj INDAM	Xnom	XM	Z score	UNITA' DI MIS.	R
2,3,7,8-TeCDD	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	1,126	0,099	1,2040	1,1479	-0,28	pg/g	12,4
1,2,3,7,8-PeCDD	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	2,364	0,143	2,5710	2,6839	-0,42	pg/g	11,6
1,2,3,4,7,8-HxCDD	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	4,224	0,310	3,8210	3,8580	0,75	pg/g	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	5,526	0,021	4,7120	4,6549	1,18	pg/g	15,2
1,2,3,7,8,9-HxCDD	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	4,310	0,027	3,5020	3,9398	1,21	pg/g	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	61,979	0,394	60,0290	62,1538	0,27	pg/g	10,8
OCDD	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	313,000	9,070	291,2340	291,7163	0,63	pg/g	11,4
2,3,7,8-TeCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	35,221	0,717	33,4350	34,1389	0,39	pg/g	13,1
1,2,3,7,8-PeCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	40,660	1,701	37,0510	36,7837	0,93	pg/g	9,3
2,3,4,7,8-PeCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	23,878	1,280	29,4810	28,6181	-0,56	pg/g	25,8
1,2,3,4,7,8-HxCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	146,131	1,066	139,1620	132,8542	0,43	pg/g	9
1,2,3,6,7,8-HxCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	63,995	0,656	61,1760	59,9965	0,49	pg/g	9,3
1,2,3,7,8,9-HxCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	9,502	0,173	17,1010	15,7693	-0,54	pg/g	75
2,3,4,6,7,8-HxCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	38,960	1,114	36,1470	35,5386	0,38	pg/g	18
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	529,412	2,842	461,5150	461,7086	1,40	pg/g	11,9
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	91,450	2,475	87,5970	87,4820	0,37	pg/g	10,4
OCDF	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	1248,106	34,124	1138,5330	1097,2095	0,67	pg/g	12,8
TEQ (PCDD/F)	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	49,957	0,573	50,8460	49,4055	-0,15	pg/g	7,9
(PCDD/F) Upperbound (U	EPA 1613	soxhlet	High Res (GC/MS/MS)	02/11/2017	INTERCIND 2017SE	SEDIMENT	49,957	0,573	50,9410	49,4484	-0,17	pg/g	7,8

r % INDAM	ACCURATEZZA SUL NOMINALE	ACCURATEZZA NEL CIRCUITO	INC ESTESA % (k=2) INTERLAB	HORWITZ RSDR%
9%	94%	98%	**14%**	125
6%	92%	88%	**13%**	110
7%	111%	109%	**15%**	104
0%	117%	119%	**18%**	102
1%	123%	109%	**18%**	104
1%	103%	100%	**12%**	69
3%	107%	107%	**13%**	54
2%	105%	103%	**15%**	75
4%	110%	111%	**11%**	74
5%	81%	83%	**30%**	77
1%	105%	110%	**10%**	61
1%	105%	107%	**11%**	69
2%	56%	60%	**87%**	85
3%	108%	110%	**21%**	75
1%	115%	115%	**14%**	51
3%	104%	105%	**12%**	65
3%	110%	114%	**15%**	45
1%	98%	101%	**9%**	71
1%	98%	101%	**9%**	71

CAMPIONE ARRIVATO IL	ANALISI PROGRAMMATA IL	ANALISI ESEGUITA IL	RISULTATI SPEDITI IL	ELABORAZIONI RICEVUTE
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017
09/06/2017	29/06/2017	29/06/2017	21/07/2017	02/11/2017

Resoconto dell'incontro del 13 novembre 2018 relativo alle analisi su terreni e vegetali eseguite da INDAM nell'ambito della sperimentazione di tecniche di biorimedio nel SIN "Brescia-Caffaro" condotta da ERSAF

In data 13 novembre 2018 la dott.ssa Stefania Balzamo, del Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA, ha effettuato una visita presso i laboratori Indam di Castel Mella (BS); a questo incontro hanno partecipato:

- per ISPRA → dott.ssa Balzamo;
- per ERSAF → dott. Nastasio, dott. Anelli, dott. Iavazzo;
- per INDAM → dott. Formentini, dott.ssa Mazzola, dott. Ippomei.

L'incontro ha avuto inizio alle ore 10.
La dott.ssa Balzamo riassume le motivazioni per la richiesta del suo intervento e le procedure utilizzate per assicurare la qualità delle misure condotte da INDAM e definite durante il precedente incontro del 18 gennaio 2018.

Successivamente la dott.ssa Balzamo illustra sinteticamente le proprie valutazioni sulle analisi eseguite da INDAM sotto la sua supervisione; in particolare dice di aver fatto valutazioni specifiche sui Quality Controls (QC) e sui campioni "ERSAF" e riferisce di aver trovato valori di CV% più alti nella ripetizione dei campioni del T0 (2018) a confronto con quelli originali (2016) mentre per il T2 "2018" a confronto con quello "2016" non si notano differenze significative.

Il dott. Ippomei precisa che nel 2016 le analisi erano state eseguite in condizioni di "ripetibilità ristretta", seguendo l'ordine definito da ERSAF con cui era avvenuta l'accettazione dei campioni e questo spiegherebbe il perché di una variabilità più bassa nelle triplette analizzate nel 2016 rispetto alla variabilità riscontrata nelle analisi condotte nel 2018 poiché i campioni delle prove eseguite in triplicato nel 2018 erano stati consegnati ad INDAM in modo randomico, mentre le aliquote consegnate nel 2016 erano siglate con "numero"/1/2/3 e riportate di seguito nell'elenco accompagnatorio dei campioni. Inoltre la dott.ssa Mazzola precisa che ai tecnici di laboratorio arrivavano campioni contrassegnati solo dal numero sequenziale interno di INDAM quindi non avevano informazioni sulle etichette originali di ERSAF. La dott.ssa Balzamo chiede a questo proposito quanti operatori lavoravano sui campioni e Ippomei risponde che per la fase di preparativa dei campioni operavano 2 tecnici e che gli operatori che vedevano e trattavano i campioni con le etichette ERSAF erano solo quelli che si occupavano della fase iniziale di preparativa che prevedeva la costituzione delle Japanese Slab Cake (JSC); tutte le fasi successive venivano condotte con campioni siglati con i codici interni forniti in accettazione,

ma sempre nell'ordine prestabilito da ERSAF (e quindi con le triplette in successione per i campioni del 2016).

La dott.ssa Balzamo segnala poi di aver notato valori di CV%, riferiti a PCB e PCDD/F, più alti nei QC che nei campioni ERSAF, situazione che considera di difficile spiegazione. ~~Secondo~~ INDAM evidenzia che i QC avevano una concentrazione di PCB molto più alta dei campioni "ERSAF" e questo potrebbe giustificare un CV% più alto rispetto a quello misurato nei campioni stessi (dovuto a una difficoltà di preparazione per analizzare insieme campioni a diversa concentrazione nella stessa sequenza e dovuto alla difficoltà di applicare una tecnica per inquinanti in tracce a matrici con concentrazioni così elevate); inoltre INDAM segnala anche che sui QC ha riscontrato delle "interferenze" .(*)
Su richiesta della dott.ssa Balzamo, INDAM dichiara che per i QC non hanno fatto una carta di controllo ad hoc ma ne avevano una già preparata che utilizzano normalmente per tenere sotto controllo le analisi: (**)

Vengono fatte alcune considerazioni anche sulla granulometria: i CRM utilizzati hanno una granulometria molto omogenea di ca. 90 micron ma secondo INDAM anche i campioni "ERSAF" presentavano una granulometria omogenea legata al tipo di preparativa. A tal riguardo INDAM richiama delle prove di granulometria eseguite all'inizio (nel 2016) servite per valutare l'efficacia del campionamento effettuato tramite JSC e ci si riserva di recuperare questi dati per una ulteriore verifica.

Vengono quindi illustrate a schermo le elaborazioni statistiche eseguite da ISPRA:

- Confronto tra T2 nuovo e T2 vecchio → si notano differenze sensibili nei CV solo in poche triplette.
- Campioni *outlier*: in alcuni campioni si sono riscontrati valori *outlier* riferiti in particolare ad alcuni congeneri.
- Confronto tra T0 nuovo e T0 vecchio → differenze di CV più marcate per tutte le triplette di campioni. Le elaborazioni sono state condotte utilizzando l'analisi della varianza ad un fattore (ANOVA)
- Elaborazioni sui CRM → per i PCB non ci sono segnalazioni, per i furani ci sono 3 congeneri (1,2,3,7,8 PeCDF; 1,2,3,7,8,9 HxCDF; 2,3,4,6,7,8 HxCDF) che presentano uno scostamento maggiore del 50% rispetto al valore assegnato del CRM. Vengono chiamati i 2 tecnici che hanno processato i campioni per queste analisi e dichiarano che per il 1° la concentrazione è molto bassa; per il 2° era nascosto sotto la prima parte del picco del 1,2,3,4,8,9 HxCDF; per il 3° c'è un interferente sotto al picco che non ~~sono riusciti a purificare.~~è possibile distinguere.

- Pb e Zn nei CRM usati per le analisi dei metalli nelle radici → è stata riscontrata una forte sottostima e quindi INDAM si riserva di verificare cosa sia successo e di comunicarlo quanto prima. (***)

Per quanto riguarda le triplette con valori di CV% più alti il dott. Anelli evidenzia come si debba tenere conto del fatto che alcune triplette (P6 e C5) sono riferite alla tesi e relativo controllo che hanno previsto l'aggiunta di compost al suolo, elemento che potrebbe aver aumentato l'eterogeneità del terreno.

ERSAF chiede a INDAM chiarimenti sulla restituzione del dato riferito ai PCB totali perché nelle ultime tornate (T4, T0 ripetuto e T2 ripetuto) non è presente il dato del PCB totale. INDAM chiarisce che nelle prime tornate era stato restituito il PCB totale sia come somma del valore assegnato alle famiglie di clorurazione derivante dalla somma dei singoli congeneri misurati, sia il dato dei PCB totali derivante dalla somma delle famiglie di clorurazione calcolate per tutti i 209 congeneri. Nelle ultime tornate è stato restituito solo il 1° dato per motivi di tempo; essendo il 2° un dato necessario a ERSAF e previsto dal capitolato di gara, INDAM provvederà a fornire questo dato secondo il seguente elenco di priorità concordato: T4, T0 e successivamente T2.

Infine si concorda che INDAM restituirà i dati finali di tutte le analisi eseguite nel 2016 e nel 2018 in formato tabella riassuntiva Excel su carta intestata e firmata; queste tabelle saranno accompagnate da una relazione (trasmessa in modo formale) con la descrizione dettagliata dell'ultima revisione della procedura utilizzata nei metodi di analisi. Questa modalità di restituzione del dato viene condivisa considerate le modalità non di routine del lavoro svolto e quindi la necessità di precisare metodi specifici utilizzati per queste particolari analisi.

ERSAF specifica che ai fini della sperimentazione verranno utilizzati i seguenti dati:

- tutti i risultati analitici relativi ai campioni rideterminati da Indam sotto la supervisione di ISPRA relativamente ai parametri oggetto di verifica;
- i risultati relativi agli altri campioni delle tornate precedenti per i quali non si è ritenuto necessario o non è stata possibile (per mancanza di un'aliquota di riserva) una ripetizione delle analisi.

INDAM precisa inoltre che le ripetizioni dei campioni sono state effettuate su altra aliquota conservata da ERSAF e consegnata ad INDAM dopo gli accordi della riunione preliminare di gennaio 2018 con ISPRA.

INDAM chiede alla dott.ssa Balzamo di inviare anche a loro la relazione finale e le elaborazioni numeriche che preparerà a conclusione della sua attività di supervisione.

L'incontro ha avuto termine alle ore 12.

(*) La matrice certificata delle diossine e furani ha un profilo gascromatografico notevolmente diverso rispetto ai campioni e in entrambe le matrici certificate le concentrazioni degli analiti in questione sono spesso molto più alte rispetto a quelle dei campioni. Le differenze più significative nel profilo gascromatografico di PCDD/F si riscontrano con una predominanza di furani nei campioni rispetto alla matrice certificata dove prevalgono le diossine.

(**) una carta di controllo attualmente prevede il monitoraggio del controllo OPR previsto dal metodo e un'altra carta di controllo prevede il monitoraggio dell'andamento degli esiti dei circuiti interlaboratorio previsti almeno annualmente

(***) la risposta è stata fornita via mail e la differenza è legata al diverso tipo di attacco previsto dal protocollo delle matrici vegetali rispetto a quello dei terreni

ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

NOTA TECNICA

Oggetto: consulenza tecnica sulle analisi dei campioni di suoli e biomasse vegetali prodotti nella sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro.

La realizzazione dell'attività di sperimentazione per la bonifica del sito contaminato SIN BRESCIA-CAFFARO è stata condotta da ERSAF (Ente Regionale per i servizi all'agricoltura e alle foreste) in collaborazione con i consulenti: Prof. Di Guardo dell'Università dell'Insubria, la Prof.ssa Sara Bodin dell'Università degli Studi di Milano e il Prof. Randa dell'Università "La Sapienza" di Roma e dai loro collaboratori. Tale sperimentazione ha visto la crescita in vaso di alcune specie vegetali, sottoposte a differenti condizioni, su un substrato costituito da terreno contaminato prelevato nelle aree agricole del SIN e coltivato in serra. Le 10 tesi sperimentali e i relativi 7 controlli, ciascuno replicato 3 volte, hanno prodotto campioni di terreno e di biomassa vegetale da sottoporre ad analisi chimiche, appaltate da ERSAF a INDAM Laboratori S.r.l. di Castel Mella (BS), laboratorio accreditato come laboratorio di prova per i parametri e nelle matrici richiesti dalla sperimentazione.

INDAM Laboratori S.r.l ha prodotto i primi risultati nel marzo 2016 (C0 e T2) che sono stati contestati dai consulenti scientifici di ERSAF esprimendo riserve sull'attendibilità dei dati analitici prodotti, riguardo in particolare, ai bassi coefficienti di variabilità dei valori delle tre repliche di campioni della stessa tesi sperimentale. ERSAF ha quindi richiesto la consulenza dell'Area di Metrologia di ISPRA per poter validare i risultati prodotti dalla INDAM Laboratori S.r.l. E' stata organizzata una prima riunione presso i laboratori di INDAM in data 18 gennaio 2018 in cui sono state prese le seguenti decisioni:

1. Analisi di tutti i parametri dei campioni di controllo e dei trattati al tempo T4.
2. Utilizzo di dei seguenti CRM (in cieco) da parte del Laboratorio durante tutte le analisi:
    a. ISPRA-ERSAF "metalli suolo";
    b. ISPRA-ERSAF "metalli vegetali";
    c. ISPRA-ERSAF "PCB"

I CRM "metalli suolo" e "PCB" dovevano essere utilizzati per le matrici suolo e radici, mentre il CRM "metalli vegetali" doveva accompagnare le analisi della parte epigea dei vegetali. L'indicazione è stata quella di utilizzare un campione di CRM ogni sequenza analitica composta da un massimo di 10 campioni per ognuna delle matrici, sia suolo che vegetali.

3. Utilizzo per tutte le analisi della seguente sequenza:
    a. 1 bianco procedurale;
    b. 1 bianco solventi;
    c. 1 controllo della taratura;
    d. 1 CRM;
    e. 10 campioni;
    f. 1 bianco solventi.
4. Effettuazione del tuning degli strumenti almeno 1 volta al giorno
5. Consegna a INDAM dei campioni T0 e T4 con etichettatura cieca e randomizzata.
6. Invio di INDAM Laboratori S.r.l, tramite ERSAF, di tutte le informazioni necessarie richieste da ISPRA per la validazione dei nuovi risultati.

Metodi di analisi utilizzati da INDAM per i parametri PCB e PCDD/F

I campioni sono stati sottoposti da INDAM ad una preparazione del campione secondo il metodo JLC (Japanese slab cake) producendo 1 campione di prova per la determinazione di PCDD/PCDF e PCB e altri 4 per le determinazioni di Pesticidi, metalli e carbonio organico, residuo secco. I bianchi sono stati effettuati su terre di diatomee. 10 g di campione estratti e poi purificati sono stati tutti analizzati mediante HRGC/HRMS.

La procedura di misura impiegata da INDAM per la determinazione di PCB e PCDD/F sia in campioni di terreno che di materiale vegetale fa riferimento rispettivamente al Metodo EPA 1668C "Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids and Tissue by HRGC/HRMS" e al Metodo 1613B (1994) Tetra-Through Octa-Chlorinated Dioxin and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS Thermo Scientific TRACE GC ULTRA accoppiato allo spettrometro di massa Thermo Scientific DFS.
Per entrambe le matrici l'estrazione è condotta mediante tecnica PFE (Pressurized Fluid extraction), avvalendosi chiaramente di due metodi diversi. La fase di purificazione prevede per la matrice materiale vegetale uno step in GPC a cui ne segue uno comune alle due matrici (cromatografia su colonna) consueto per questi tipi di misurandi. Prima della fase di estrazione, di quella di purificazione e dell'iniezione strumentale sono aggiunti gli standard interni labellati (13C) di PCB e PCDDF in quantità in massa come da metodi EPA (metodi in diluizione isotopica).
La determinazione strumentale su massa magnetica è stata condotta utilizzando le condizioni operative come da metodi.
Nella relazione tecnica fornita da INDAM sulla procedura di misura delle sostanze sopra indicate sono descritte esclusivamente le modalità operative della procedura.
Il laboratorio ha fornito poi lo studio di precisione condotto in condizioni di ripetibilità ristretta per la misura di PCB e di PCDD/F in terreni e sedimenti. Sono state considerate 10 misure indipendenti di un terreno contaminato. Nello studio di precisione condotto è stata valutata la presenza di dati anomali mediante il test di Dixon anche se poi i valori anomali registrati per i PCB non sono stati esclusi per non rischiare di sottostimare i coefficienti di variazione corrispondenti.
I dati di riproducibilità dichiarati (modulo 107 A4- riferimento procedura PG 107 del 7/6/2017) evidenziano, per la misura di PCB, un CV% compreso in un intervallo tra 2 e oltre il 50%; intervallo che risulta similare a quello riportato per la misura dei PCB nei campioni ripetuti nel 2018 e mediamente più alto di quelli analizzati nel 2016.

I dati di ripetibilità dichiarati (modulo 107 A4- riferimento procedura PG 107 del31/5/2017) evidenziano per la misura di PCDD/F un CV% compreso in un intervallo tra 3 e oltre il 20%; intervallo che risulta similare a quello riportato per la misura dei PCDD/F nei campioni ERSAF ripetuti nel 2018 con una variabilità maggiore rispetto a quelli analizzati nel 2016 ma non particolarmente più alta.

Elaborazioni eseguite sui primi risultati di INDAM Laboratori Srl

E' stato eseguito il calcolo del coefficiente di variazione percentuale (CV%) per le varie repliche indipendenti effettuate sui CRM in concomitanza all'esecuzione delle analisi condotte sui campioni ed è stato anche calcolato l'indice di compatibilità En rispetto al CRM secondo la norma ISO 13528:2015 "Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison". L'indice viene calcolato con l'equazione mostrata di seguito:

$$En = \frac{X_{LAB} - X_{RM}}{\sqrt{U(X_{LAB})^2 + U(X_{RM})^2}}$$

dove:
X_{LAB} = risultato ottenuto dal laboratorio nell'analisi del Materiale di riferimento
X_{RM} = valore assegnato presente nel certificato del materiale di riferimento
$U(X_{LAB})$ = incertezza estesa del laboratorio nell'analisi del Materiale di riferimento
$U(X_{RM})$ = incertezza estesa del valore assegnato presente nel certificato del materiale di riferimento

Sono state eseguite valutazioni statistiche e grafiche sui CV% dei campioni analizzati nel 2018 rispetto ai risultati prodotti da INDAM nel 2016.

Considerazioni finali:

Nella valutazione di questi risultati, si possono fare alcune considerazioni finali.
Generalmente la variabilità dei risultati sullo studio di ripetibilità condotto su campioni ERSAF e quella riscontrata sui nuovi risultati dei campioni sperimentali è paragonabile.
Per questo motivo si consiglia di continuare le analisi dei campioni della sperimentazione per verificare se le successive analisi confermano questi andamenti.
Si consiglia comunque che per comparare i risultati dei controlli e dei diversi trattamenti ai diversi tempi di sperimentazione è necessario validare i risultati di laboratorio di analisi anche di quelli eseguiti al tempo T2
Sarebbe necessario continuare ha utilizzare le stesse regole già concordate:

- **Effettuazione del tuning degli strumenti almeno 1 volta al giorno**
- **Utilizzare la sequenza di analisi concordata già soprariportata**
- **Etichettare i campioni in modo cieco per il laboratorio di analisi**
- **Utilizzare un Materiale di Riferimento cieco in ogni sequenza di analisi al fine di poter controllare i risultati del CRM e quelli dei campioni processati in contemporanea.**

Il presente parere tecnico ISPRA, reso a seguito di richiesta della Regione Lombardia prot. n.6244 del 3/2/2017, è da considerarsi quale mera valutazione tecnica specificatamente riferita all'oggetto della richiesta, in concorso con eventuali altri pareri resi da altri soggetti eventualmente individuati.
Il presente parere è reso per la seguente finalità:

- valutazione della qualità di dati analitici di PCDD/PCDF e PCB di campioni di suoli e biomasse vegetali prodotti nella sperimentazione di tecniche di biorimedio in serra nel SIN Brescia-Caffaro

L'ambito di validità del parere è finalizzato esclusivamente alla predetta finalità.

ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Allegato 1

Limiti di Quantificazione di INDAM per i PCB

PCB	LOQ	LOQ
terreno	ng/mL o pg/uL	ug/kg
PCB 138	0,7	0,0014
PCB 158		
PCB 129		
PCB 128	1	0,002
PCB 187	0,3	0,0006
PCB 183	0,7	0,0014
PCB 177	1	0,002
PCB 171		
PCB 180	1	0,002
PCB 193		
PCB 191		
PCB 170	0,8	0,0016
PCB 200		
PCB 199		
PCB 201		
PCB 196 + 203	0,9	0,0018
PCB 194	0,4	0,0008
PCB 207		

peso campione terreno PCB (g)	10
Vcampione (uL)	20

PCDDFs	LOQ	LOQ
lattughino	ng/mL o pg/uL	ug/kg
PCB 81	0,07	0,00028
PCB 77	0,02	0,00008
PCB 123	0,6	0,0024
PCB 118	0,4	0,0016
PCB 114	0,4	0,0016
PCB 105	0,4	0,0016
PCB 126	0,4	0,0016
PCB 167	0,008	0,000032
PCB 156	0,003	0,000012
PCB 157	0,01	0,00004
PCB 169	0,08	0,00032
PCB 189	0,2	0,0008
PCB 209	0,06	0,00024
PCB 1	0,1	0,0004
PCB 28	1	0,004
PCB 52	0,9	0,0036
PCB 101 + 90	1	0,004
PCB 153 + 168	1	0,004
PCB 138	0,7	0,0028
PCB 180	1	0,004
PCB 95	0,5	0,002
PCB 99	1	0,004
PCB 110	0,8	0,0032
PCB 146	0,4	0,0016
PCB 149	0,3	0,0012
PCB 151	0,005	0,00002
PCB 170	0,8	0,0032
PCB 177	1	0,004
PCB 183	0,7	0,0028
PCB 187	0,3	0,0012
PCB 128	1	0,004
PCB 194	0,4	0,0016
PCB 196 + 203	0,9	0,0036
PCB 8	0,9	0,0036
PCB 18	0,6	0,0024
PCB 31	0,8	0,0032
PCB 44	1	0,004
PCB 70	0,4	0,0016
PCB 97	0,7	0,0028
PCB 87	1	0,004
PCB 137	1	0,004

peso campione lattughino PCB (g)	5
Vcampione (uL)	20

ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

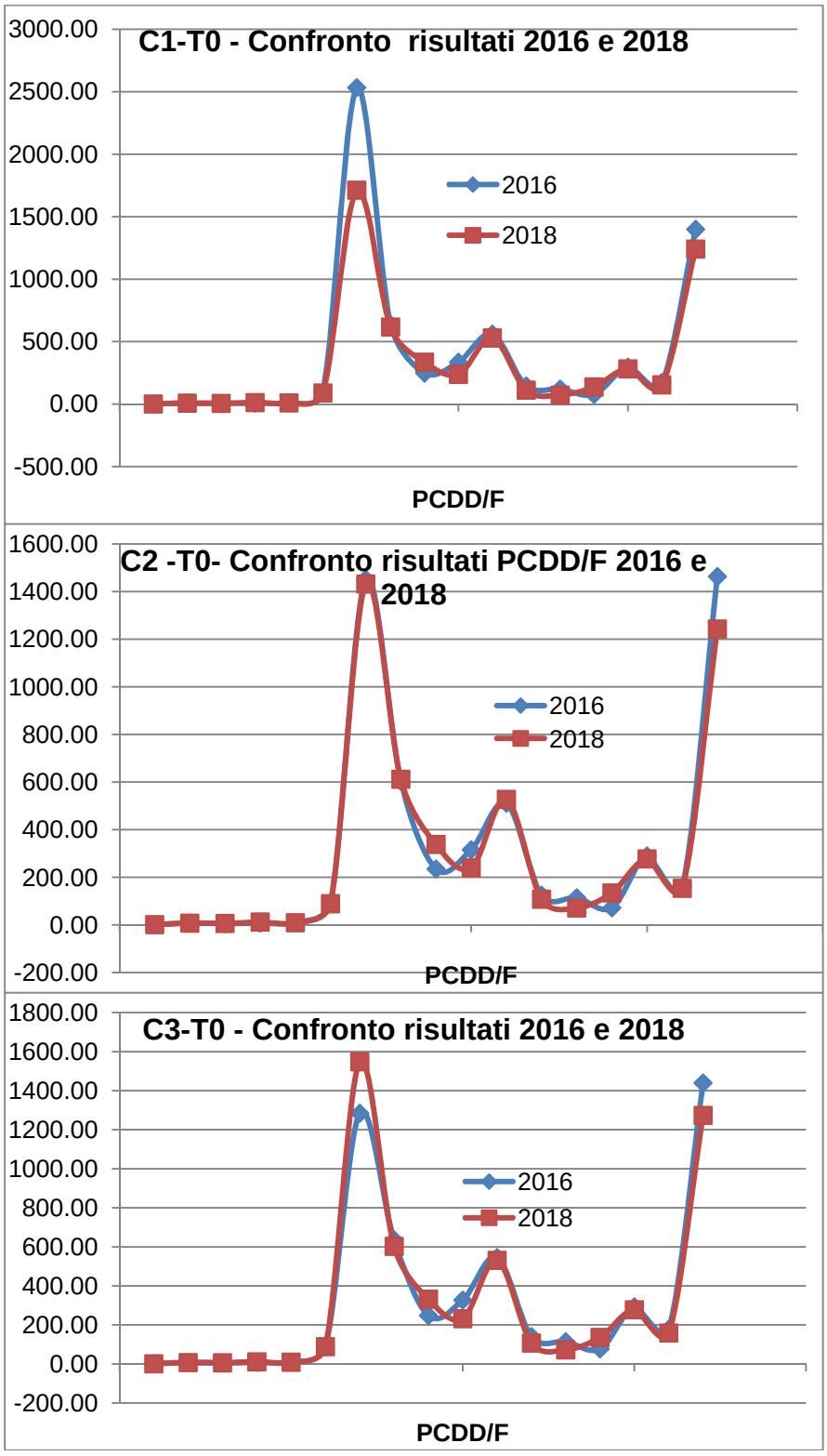
Limiti di Quantificazione di INDAM per i PCDD/F

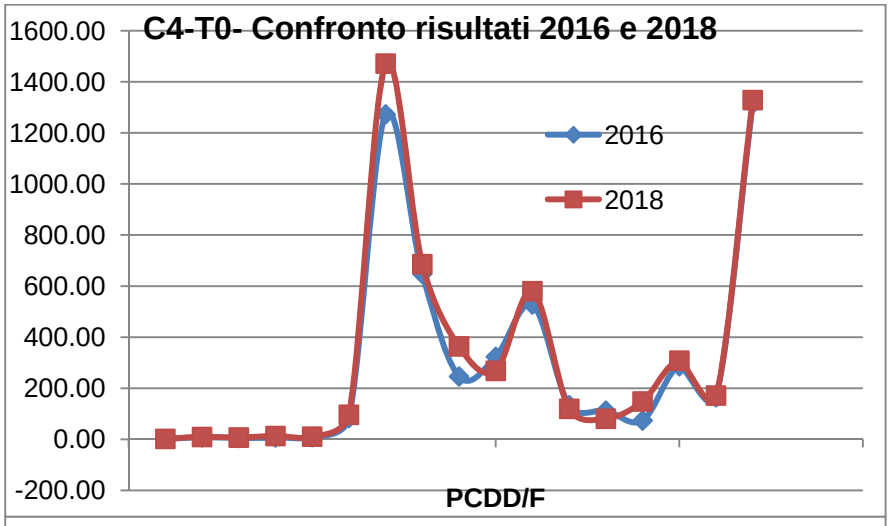
PCDDFs	LOQ	LOQ
terreno	ng/mL o pg/uL	pg/g o ng/kg
2,3,7,8 TCDD	0,02	0,1
1,2,3,7,8 PeCDD	0,05	0,25
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,05	0,25
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,2	1
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,2	1
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,04	0,2
OCDD	0,1	0,5
2,3,7,8 TCDF	0,005	0,025
1,2,3,7,8 PeCDF	0,05	0,25
2,3,4,7,8 PeCDF	0,05	0,25
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,1	0,5
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,2	1
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,07	0,35
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,1	0,5
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0,03	0,15
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0,1	0,5
OCDF	0,2	1
peso campione terreno PCDDF (	10	
Vcampione (uL)	50	

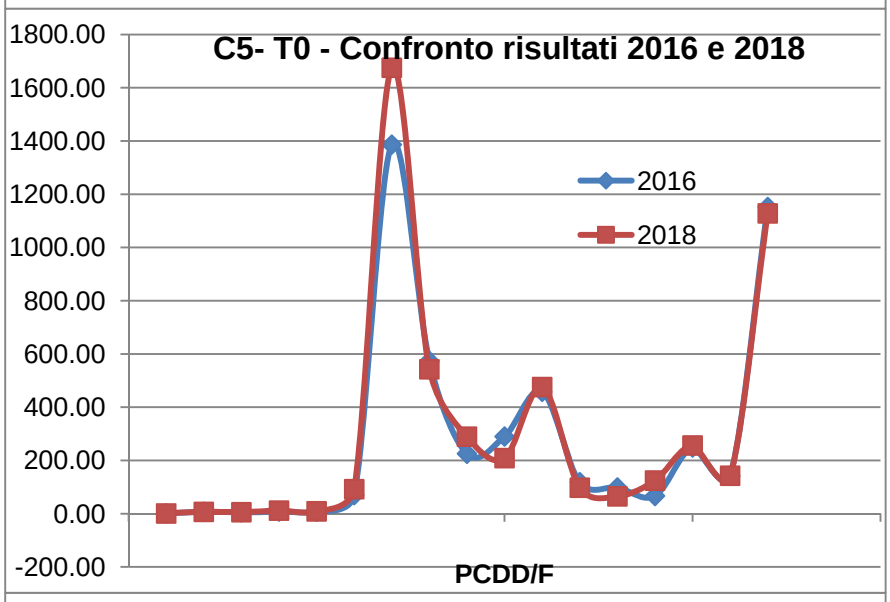
PCDDFs	LOQ	LOQ
lattughino	ng/mL o pg/uL	pg/g o ng/kg
2,3,7,8 TCDD	0,02	0,08
1,2,3,7,8 PeCDD	0,05	0,25
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,05	0,25
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,2	1
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,2	1
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,04	0,2
OCDD	0,1	0,5
2,3,7,8 TCDF	0,005	0,025
1,2,3,7,8 PeCDF	0,05	0,25
2,3,4,7,8 PeCDF	0,05	0,25
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,1	0,5
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,2	1
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,07	0,35
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,1	0,5
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0,03	0,15
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0,1	0,5
OCDF	0,2	1
peso campione terreno PCDDF (g	5	
Vcampione (uL)	20	

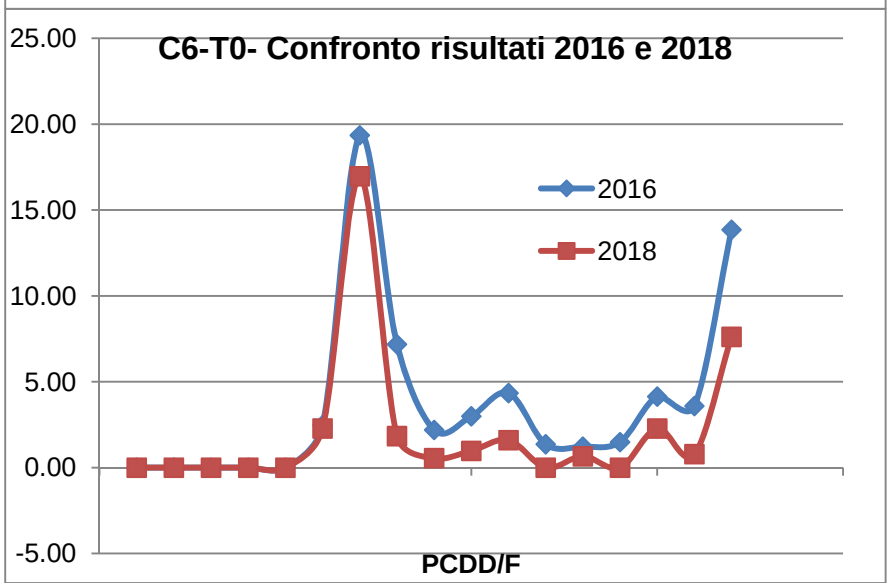
ALLEGATO 11

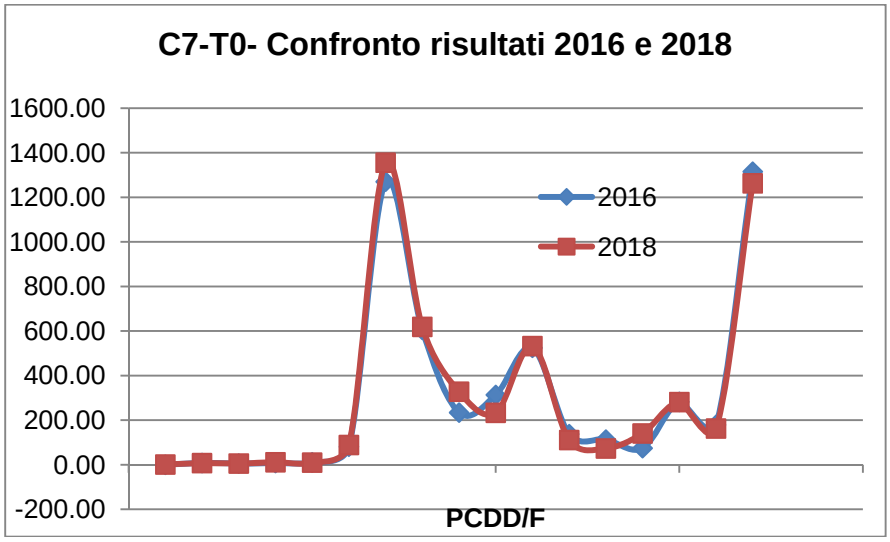
Confronto delle frazioni in massa (pg/g) di PCDD/F nei campioni di biorimedio negli anni 2016 e 2018 per il tempo t0, l'ordine delle PCDFs sulle ascisse è quello riportato nella tabella 8 della relazione




C4-T0- Confronto risultati 2016 e 2018
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018
PCDD/F

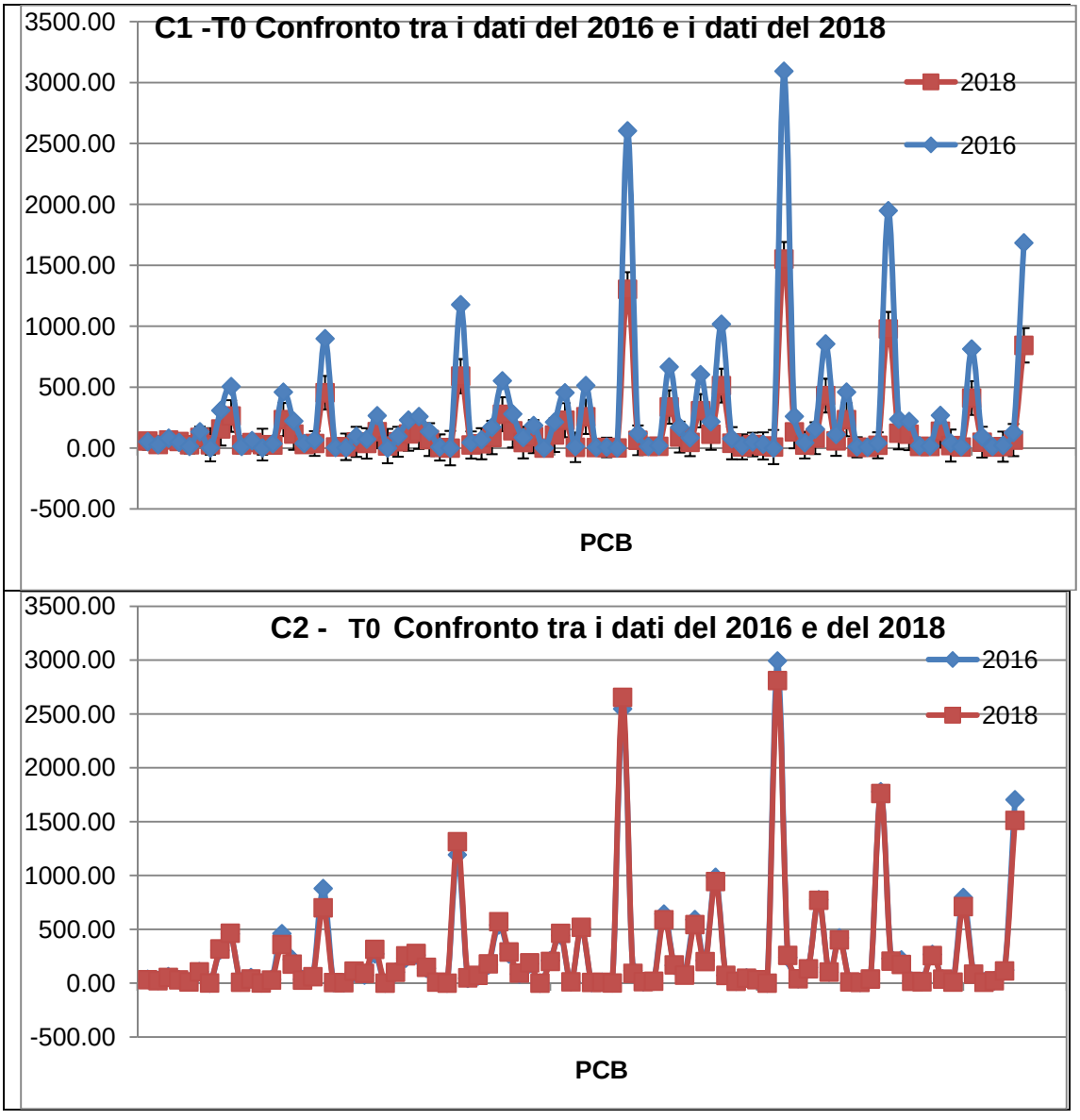

C5- T0 - Confronto risultati 2016 e 2018
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018
PCDD/F

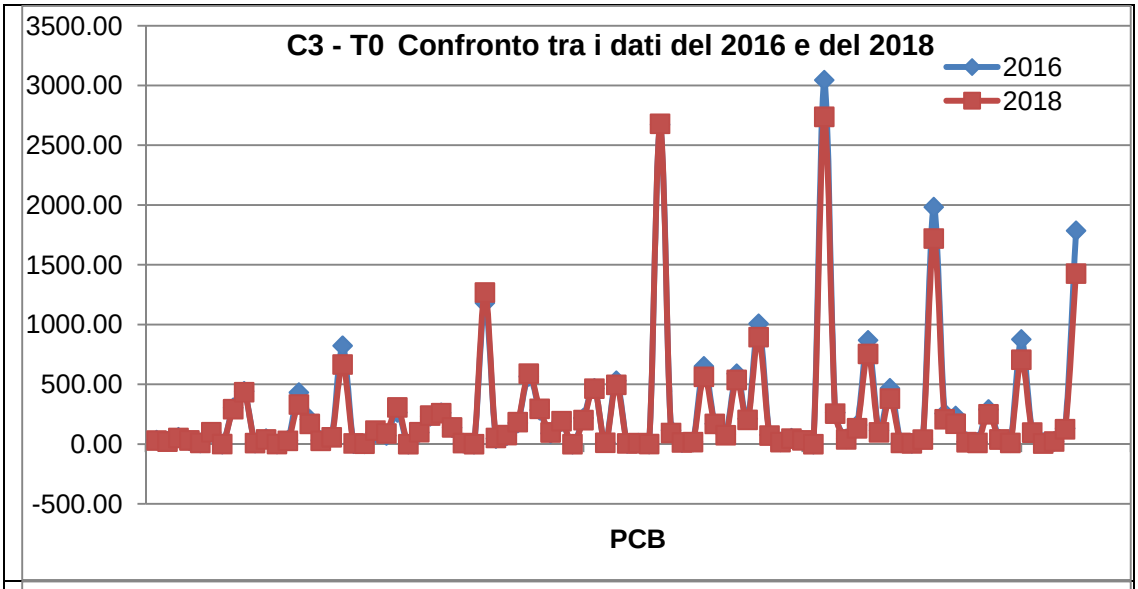

C6-T0- Confronto risultati 2016 e 2018
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
-5.00
2016
2018
PCDD/F

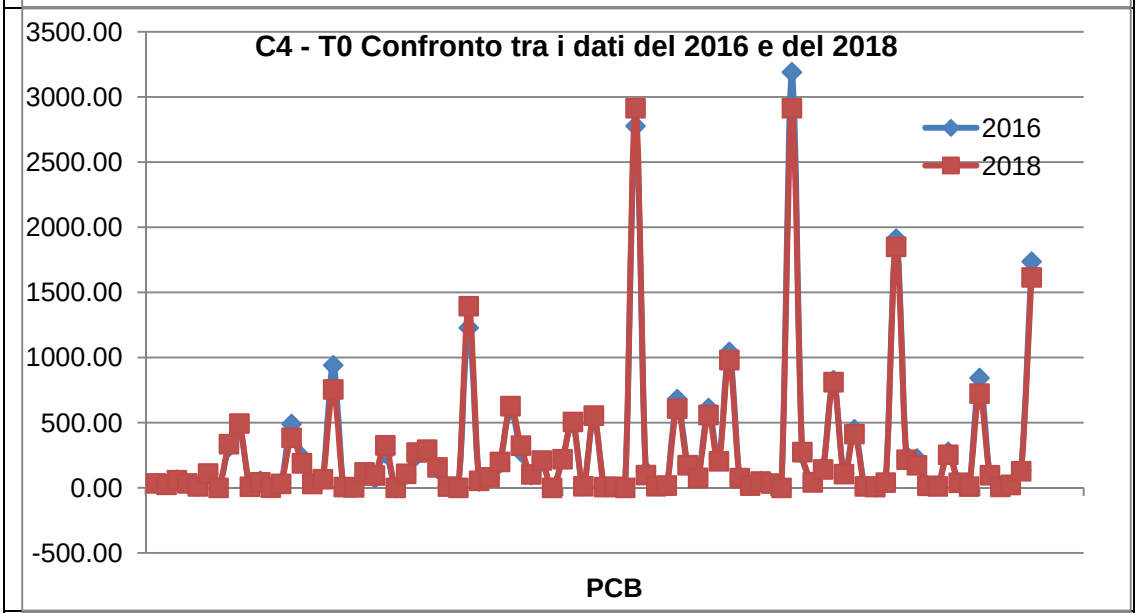

C7-T0- Confronto risultati 2016 e 2018
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018
PCDD/F

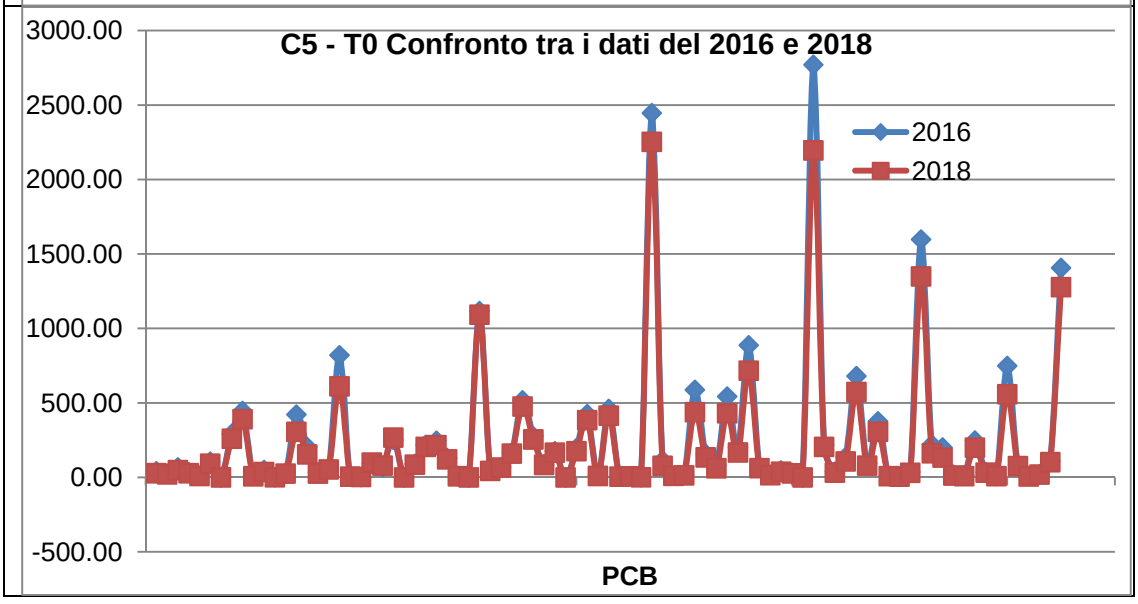
ALLEGATO 12

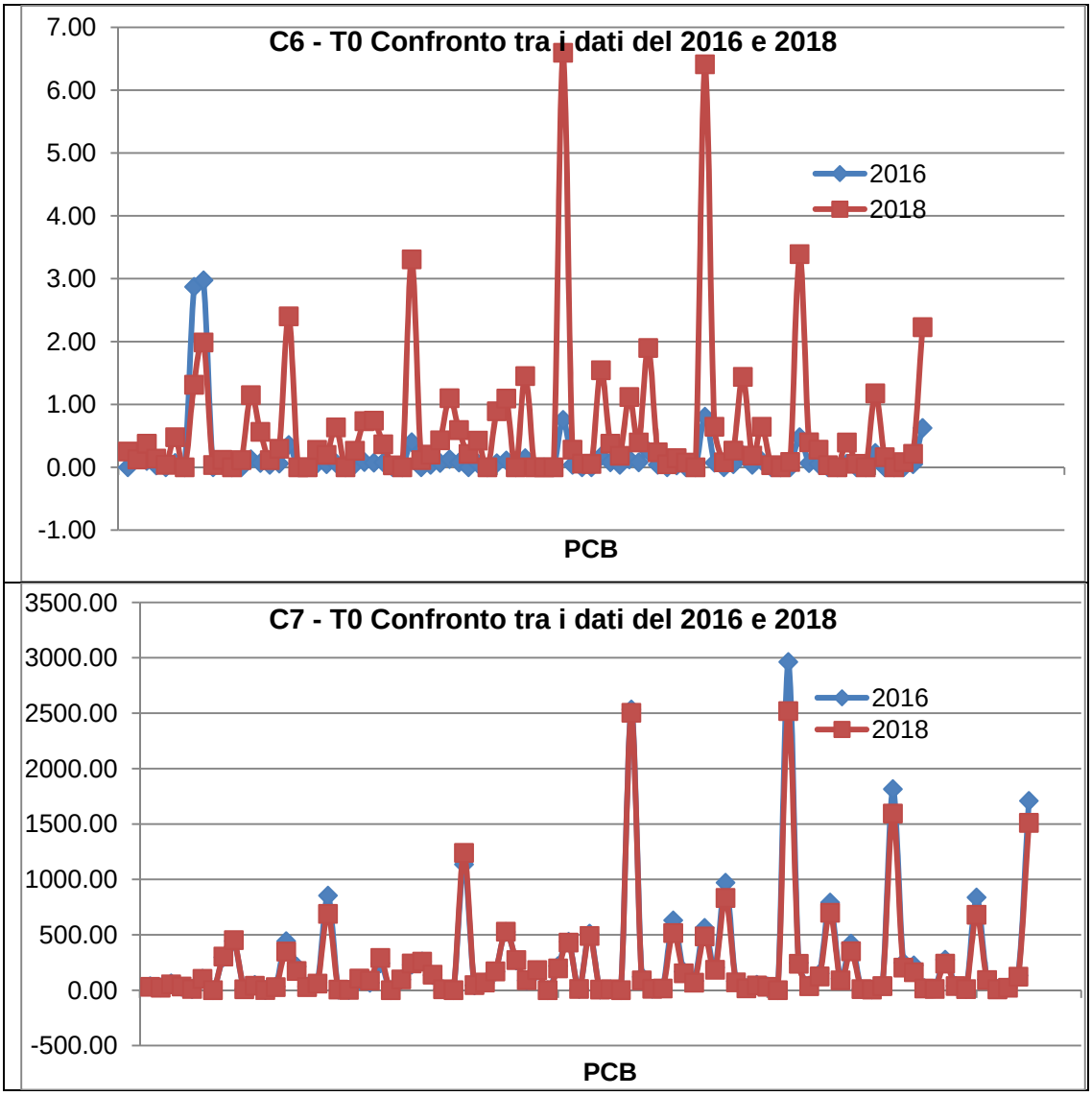
Confronto delle frazioni in massa (ug/kg) di PCBnei campioni di biorimedio negli anni 2016 e 2018 per il tempo t0, l'ordine delle PCDFs sulle ascisse è quello riportato nella tabella 8 della relazione




C3 - T0 Confronto tra i dati del 2016 e del 2018
2016
2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
PCB

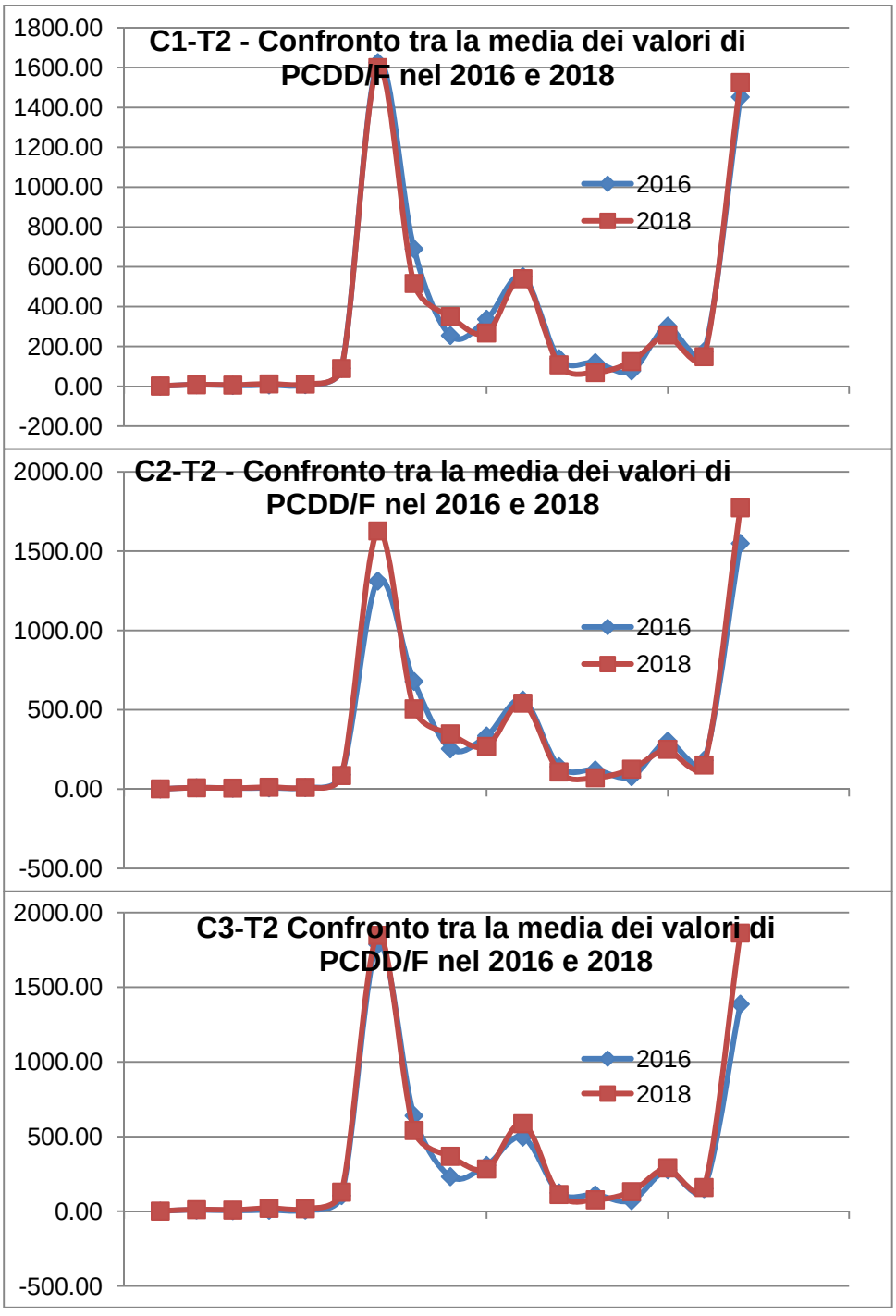

C4 - T0 Confronto tra i dati del 2016 e del 2018
2016
2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
PCB

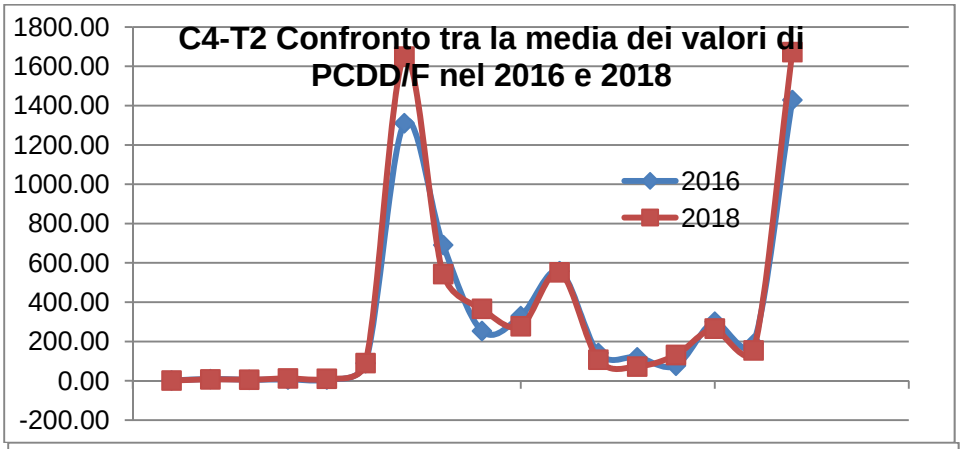

C5 - T0 Confronto tra i dati del 2016 e 2018
2016
2018
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
PCB

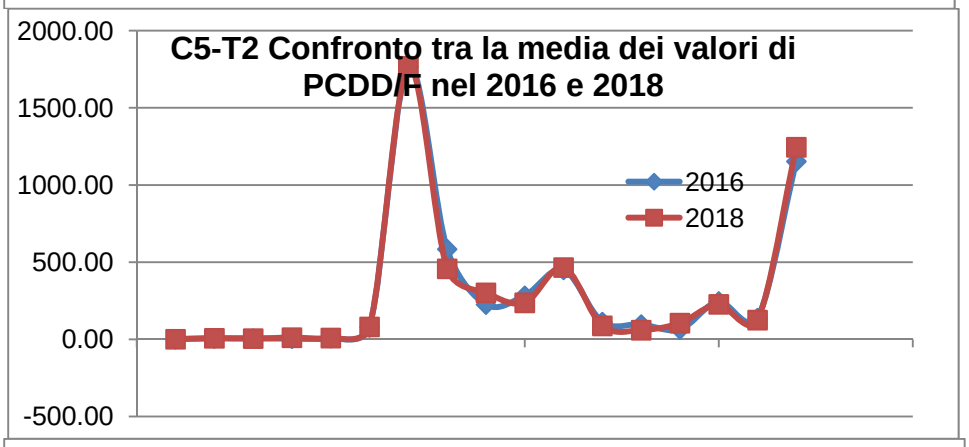

C6 - T0 Confronto tra i dati del 2016 e 2018
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-1.00
2016
2018
PCB
C7 - T0 Confronto tra i dati del 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018
PCB

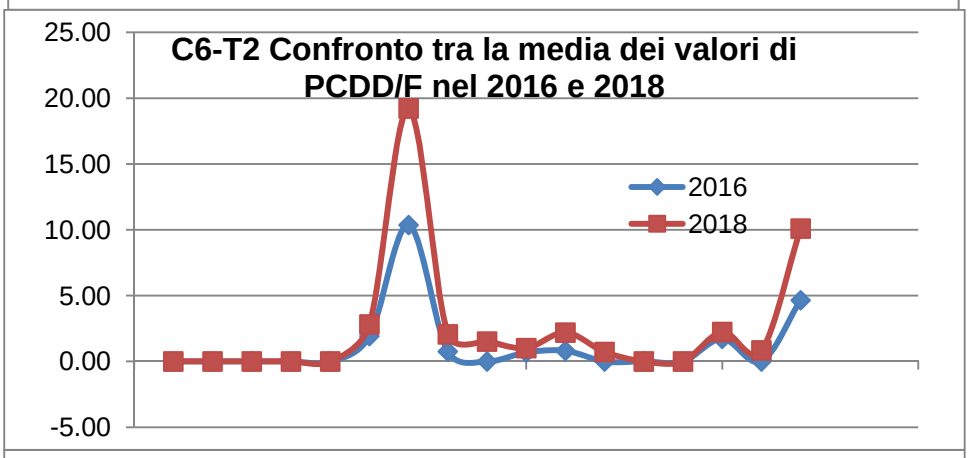
ALLEGATO 13

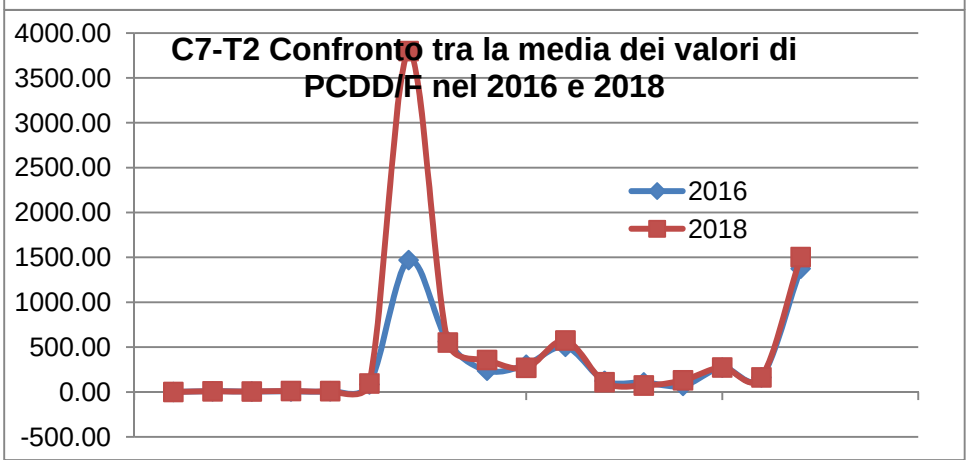
Confronto delle frazioni in massa (pg/g) di PCDD/F nei campioni di biorimedio negli anni 2016 e 2018 per il tempo t2, l'ordine delle PCDFs sulle ascisse è quello riportato nella tabella 8 della relazione

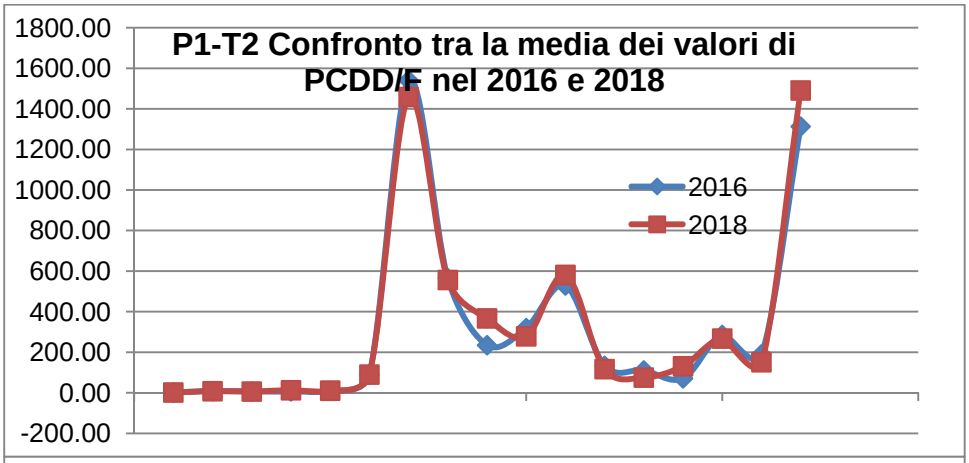


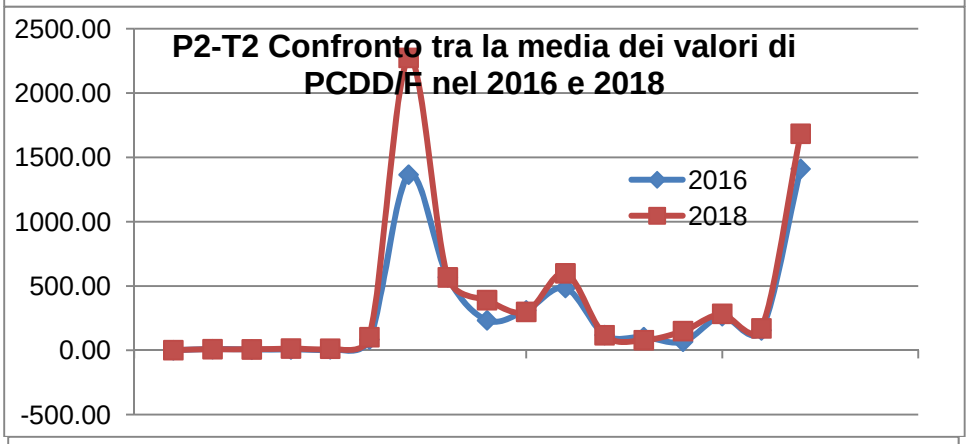

C4-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018

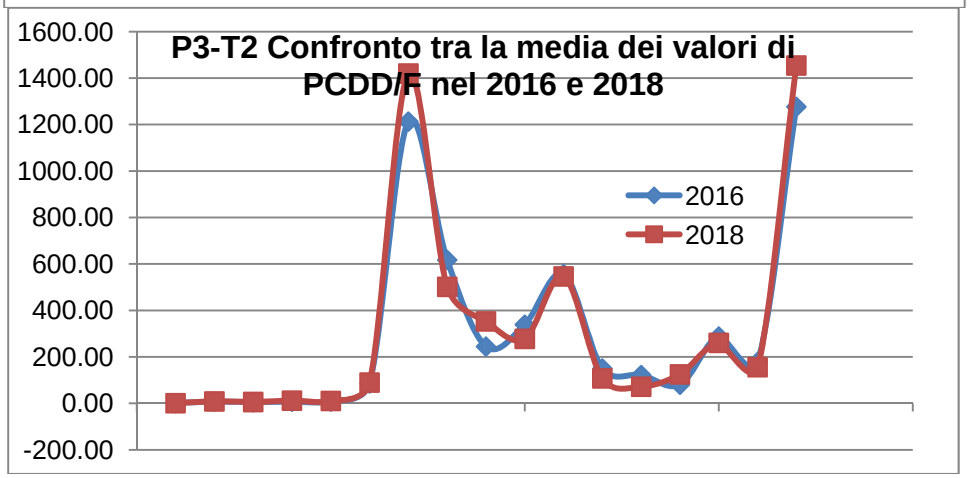

C5-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

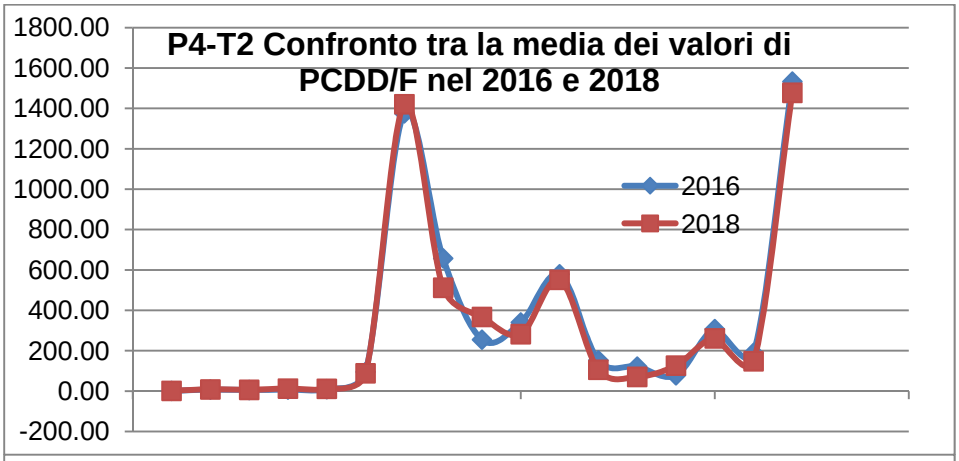

C6-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
-5.00
2016
2018

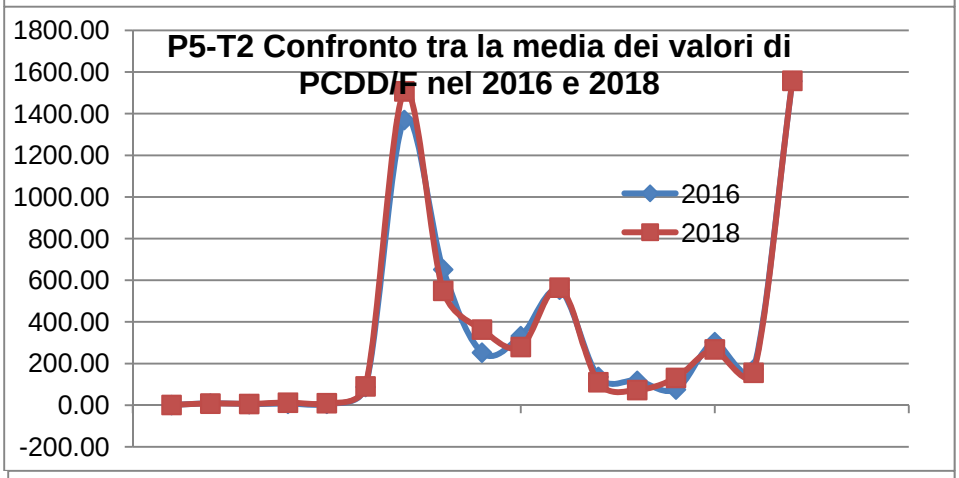

C7-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
4000.00
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

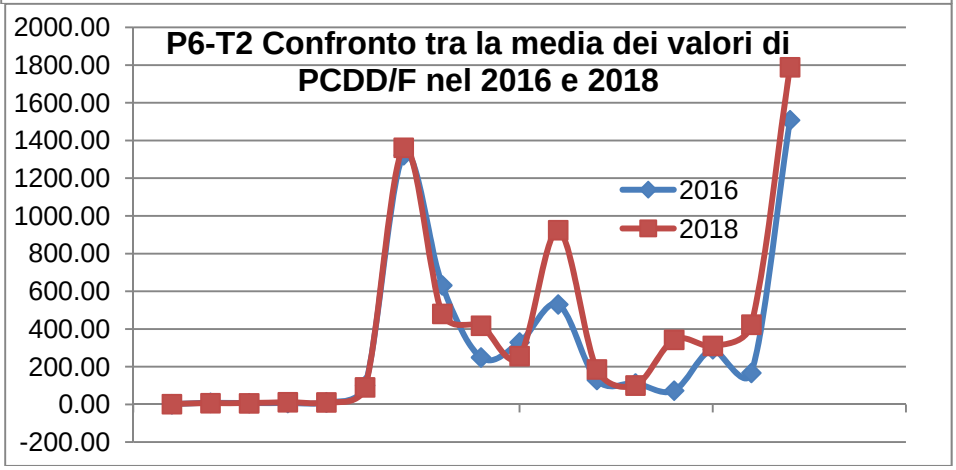

P1-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018

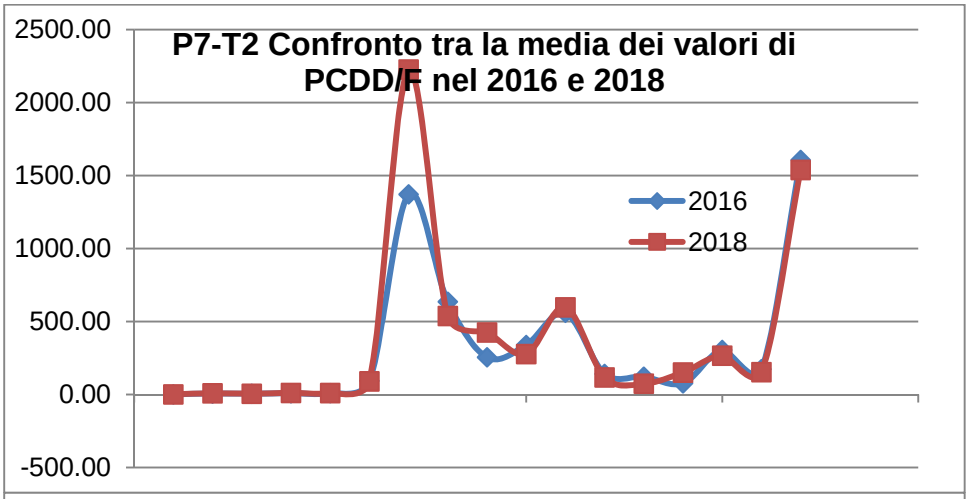

P2-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

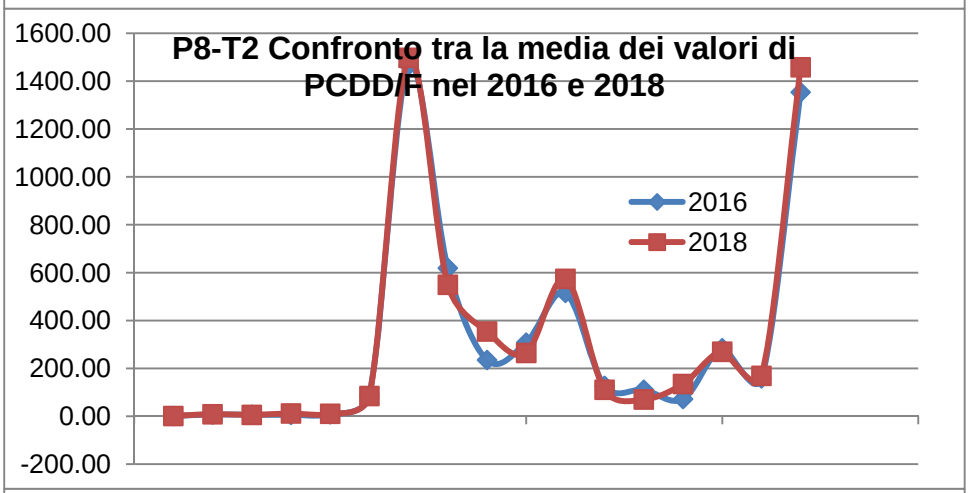

P3-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018

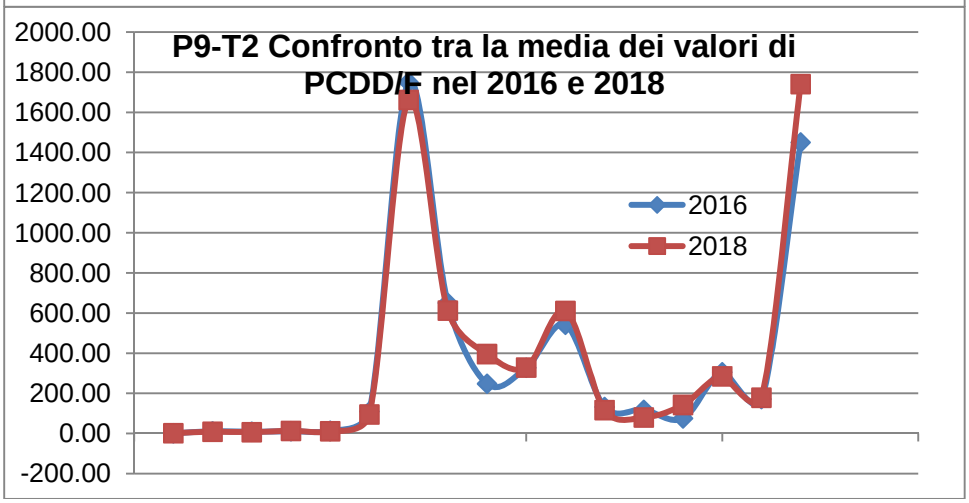

P4-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018

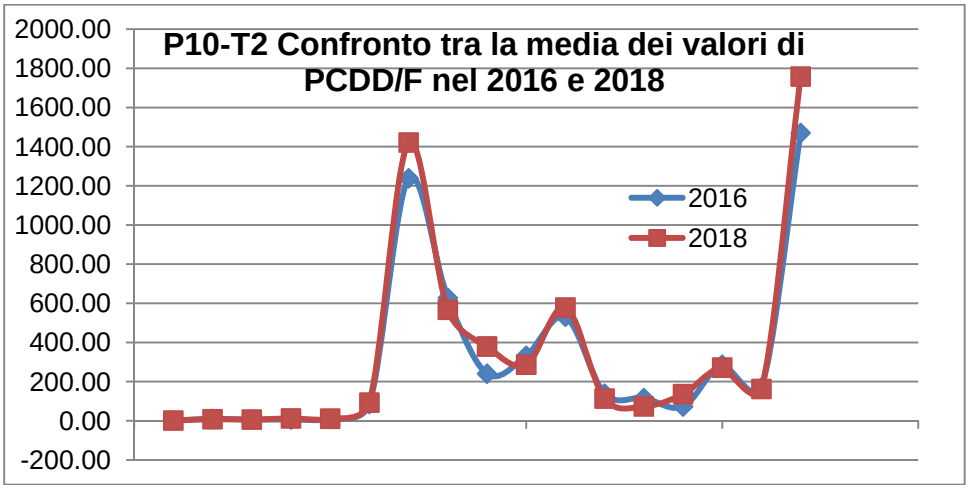

P5-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018


P6-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
2000.00
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018


P7-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

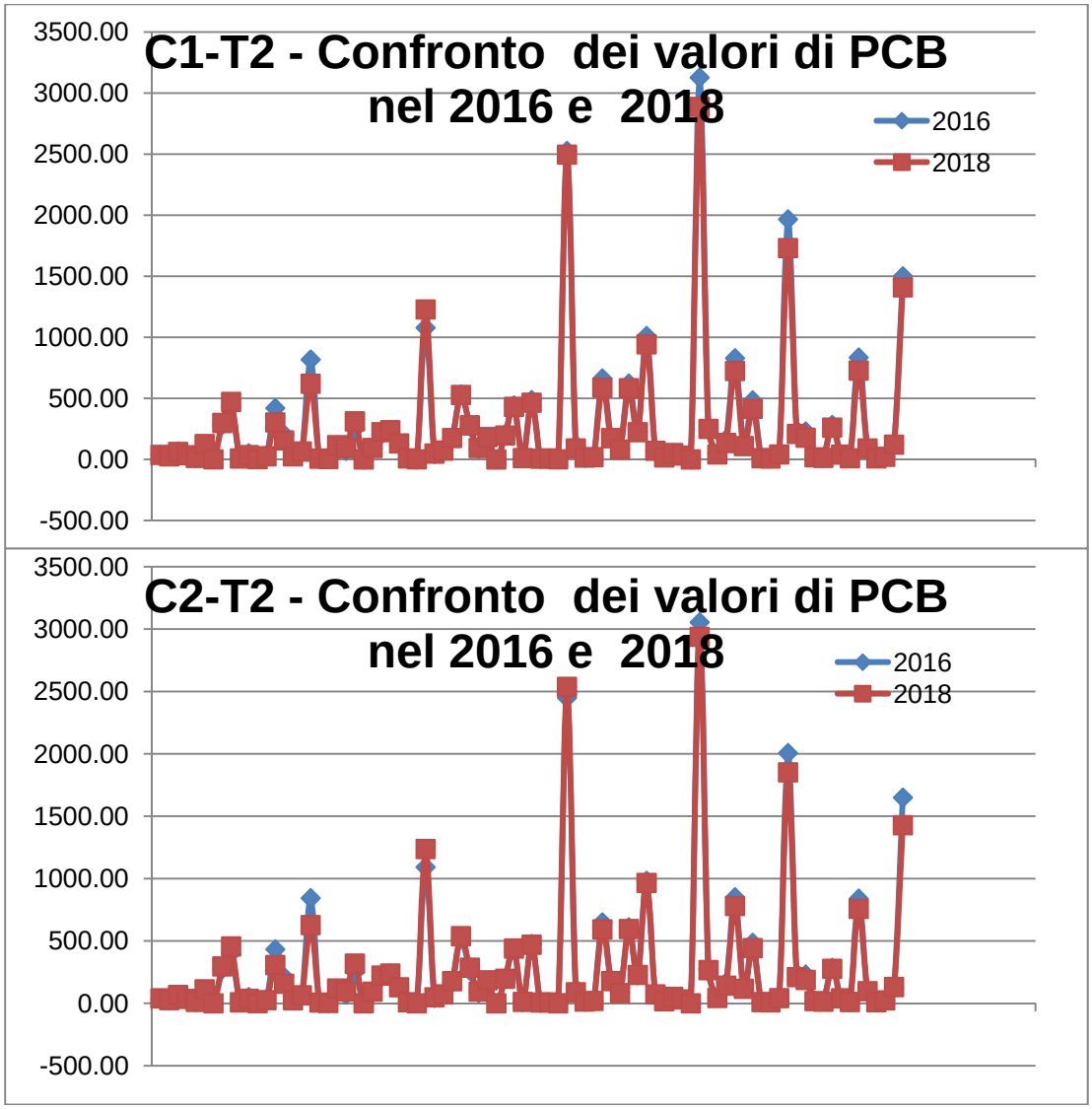

P8-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018

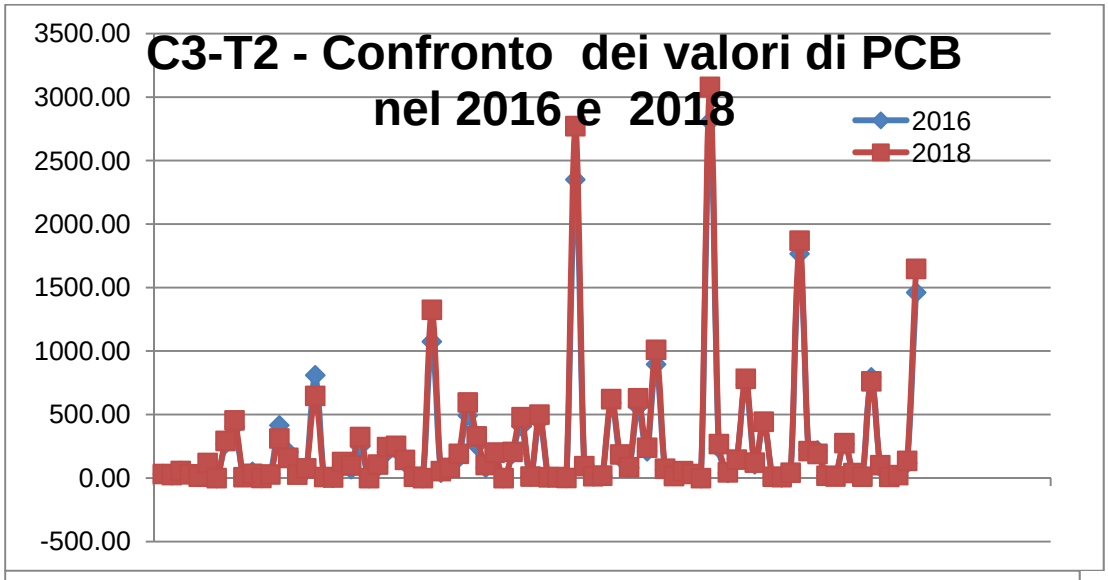

P9-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
2000.00
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018

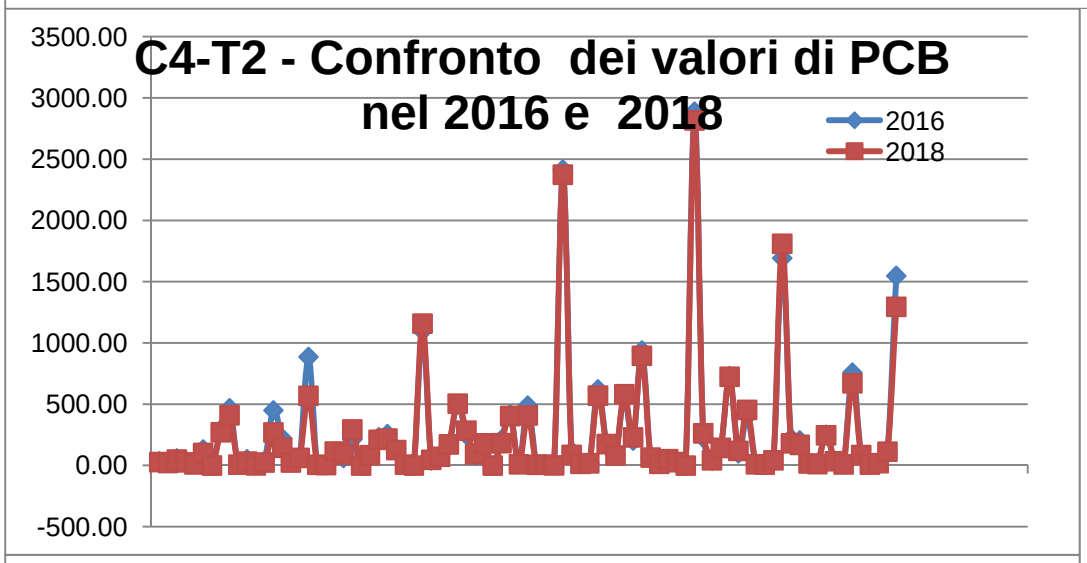

P10-T2 Confronto tra la media dei valori di PCDD/F nel 2016 e 2018
2000.00
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
-200.00
2016
2018

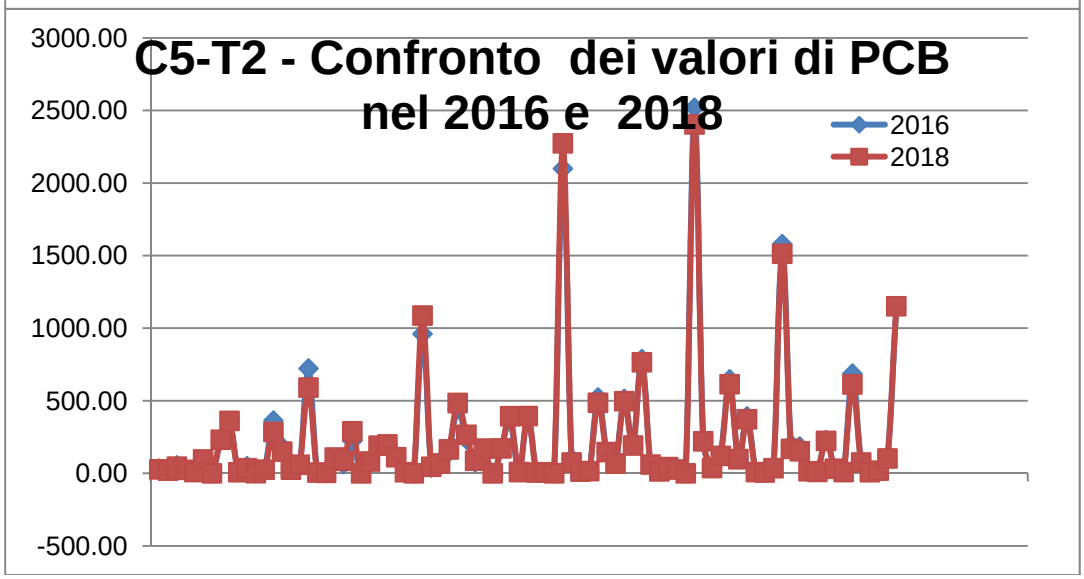
ALLEGATO 14

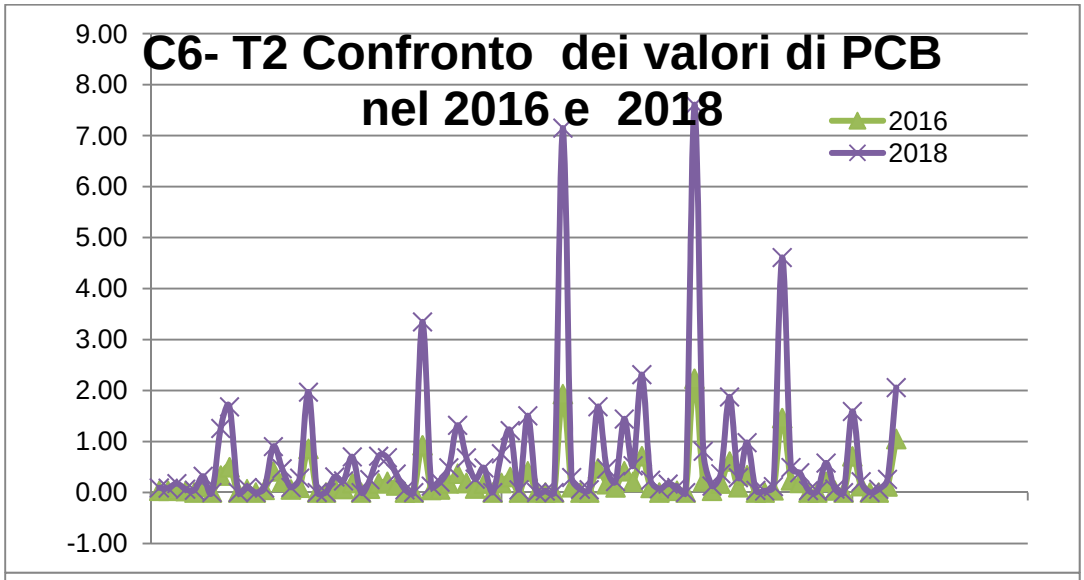
Confronto delle frazioni in massa (ug/kg) di PCB nei campioni di biorimedio negli anni 2016 e 2018 per il tempo t2, l'ordine dei PCB sulle ascisse è quello riportato nella tabella 8 della relazione

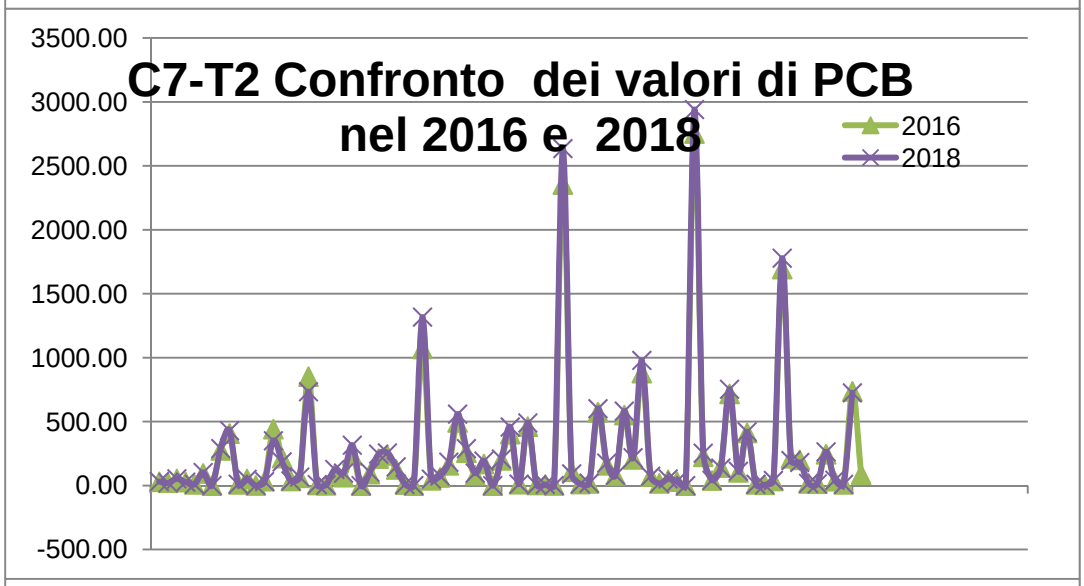


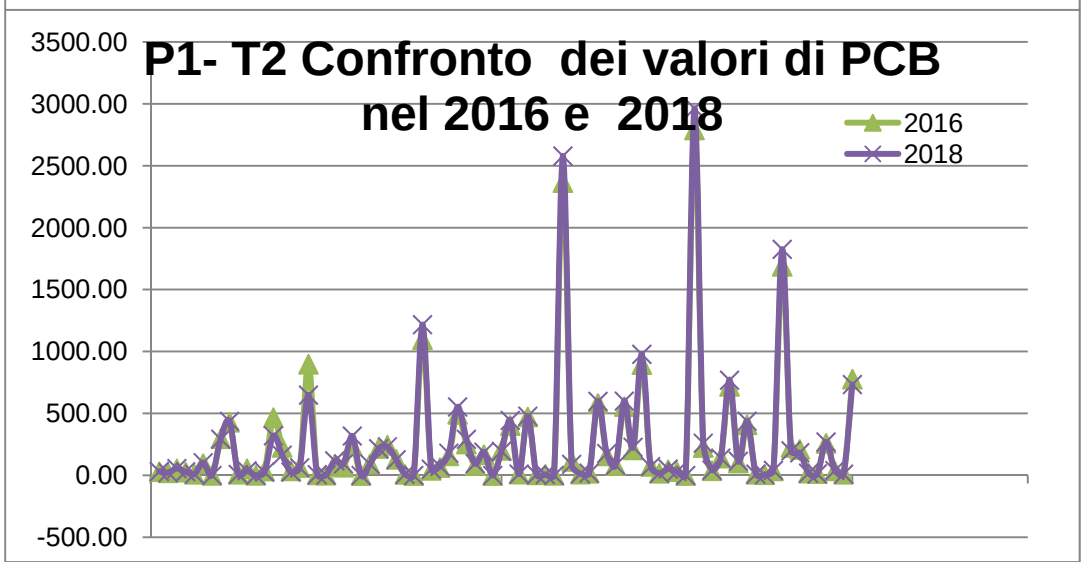

C3-T2 - Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

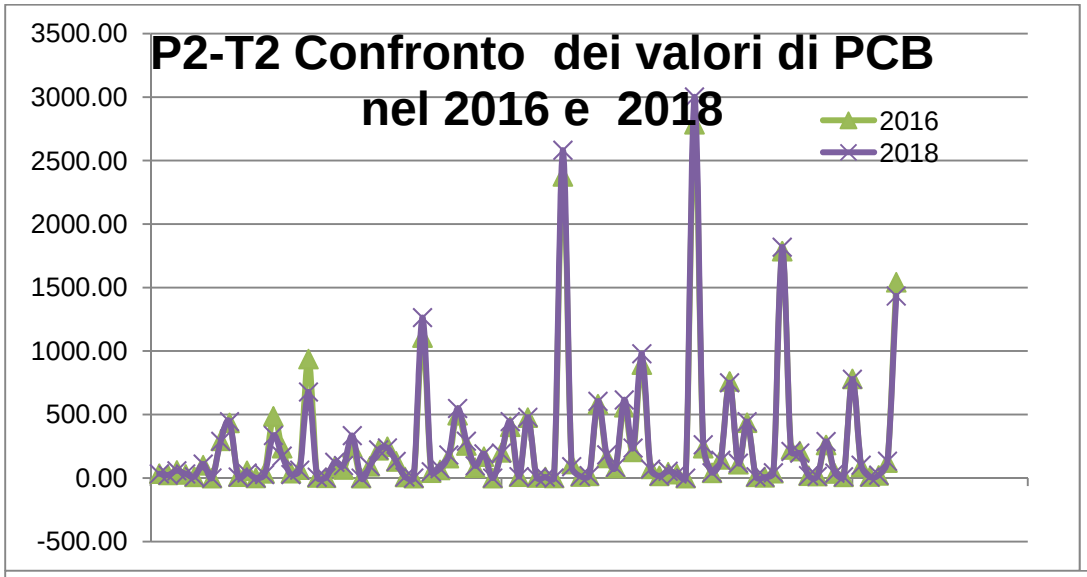

C4-T2 - Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

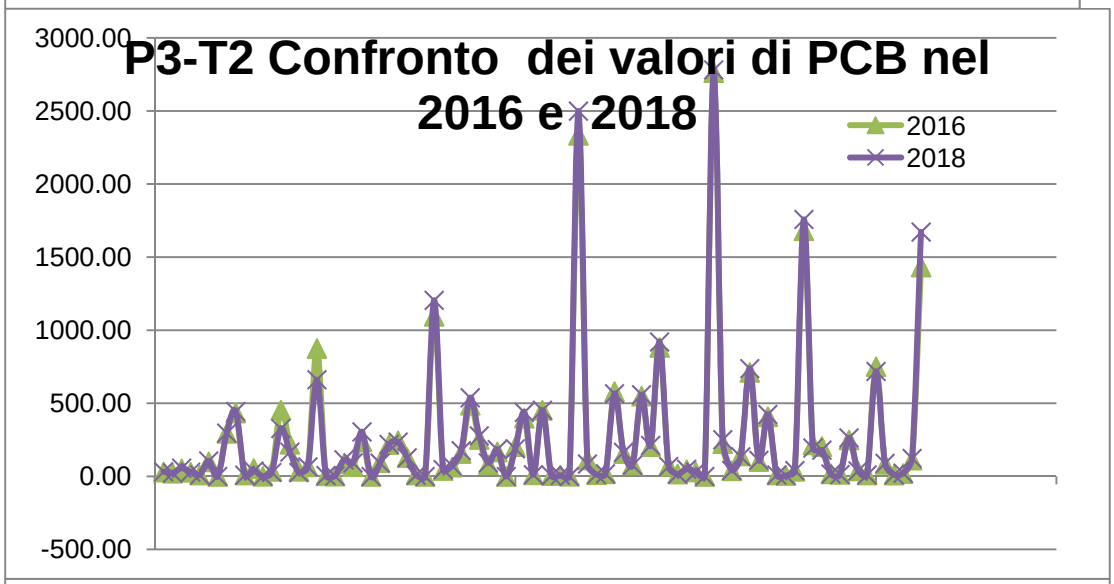

C5-T2 - Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

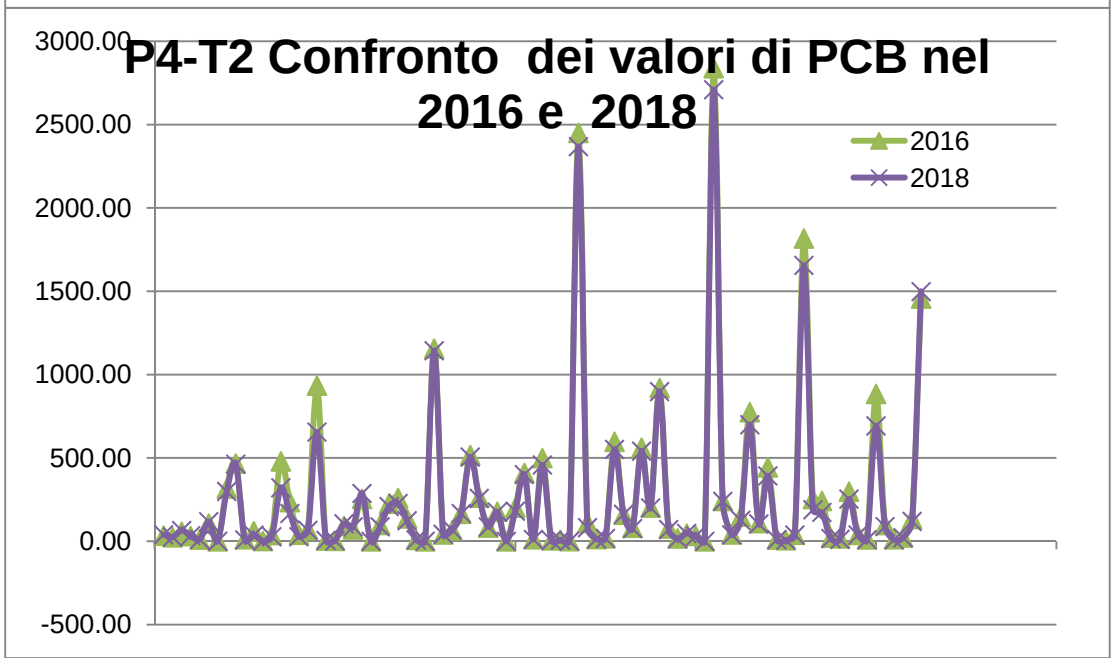

C6- T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
2016
2018
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-1.00

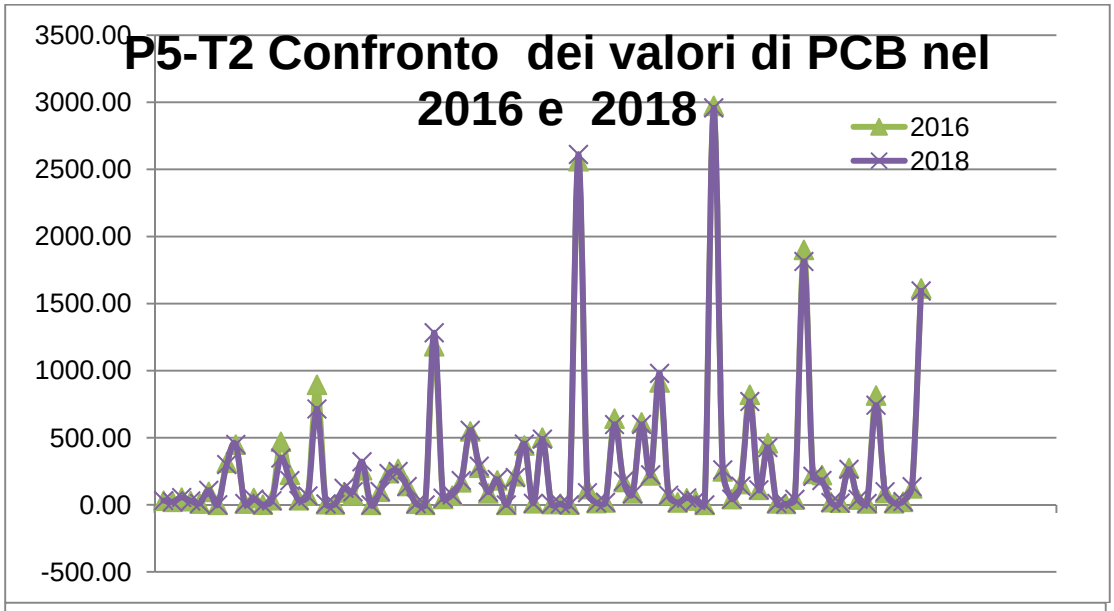

C7-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
2016
2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00

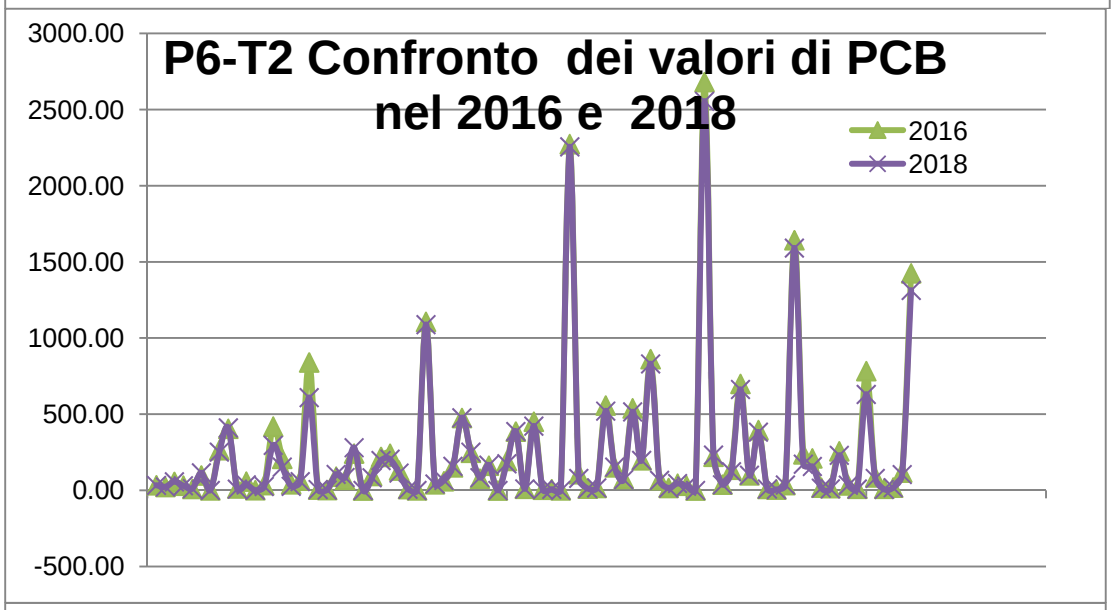

P1- T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
2016
2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00

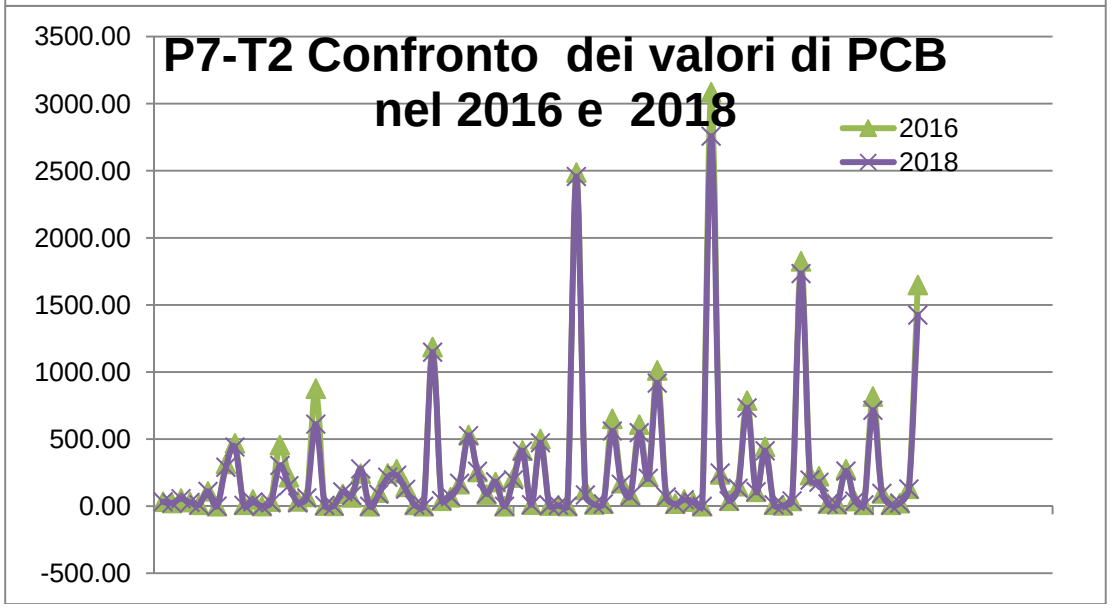

P2-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

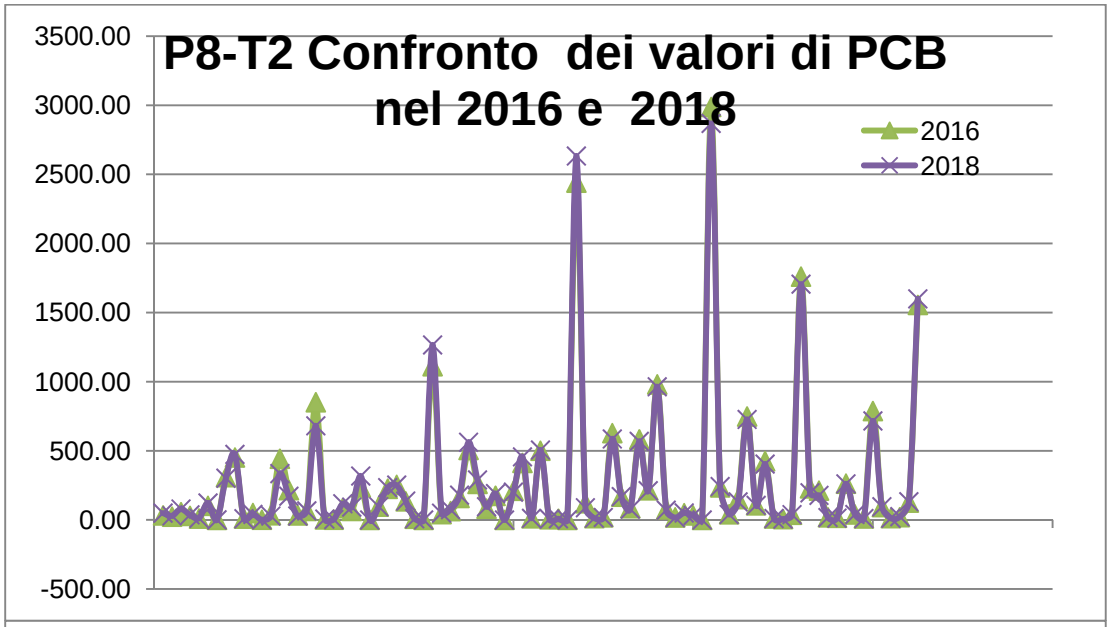

P3-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

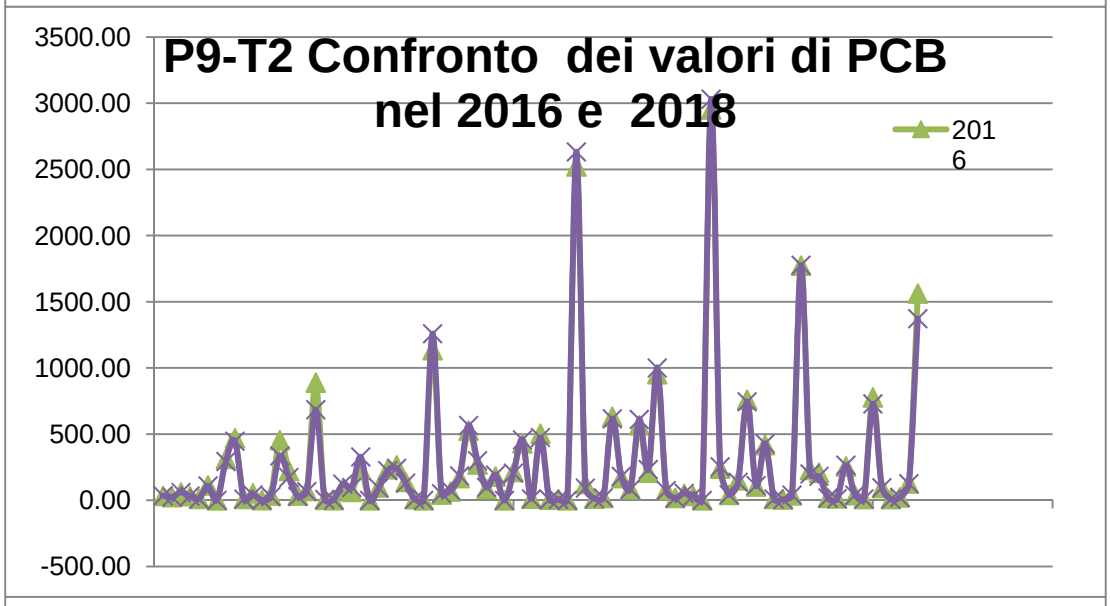

P4-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018

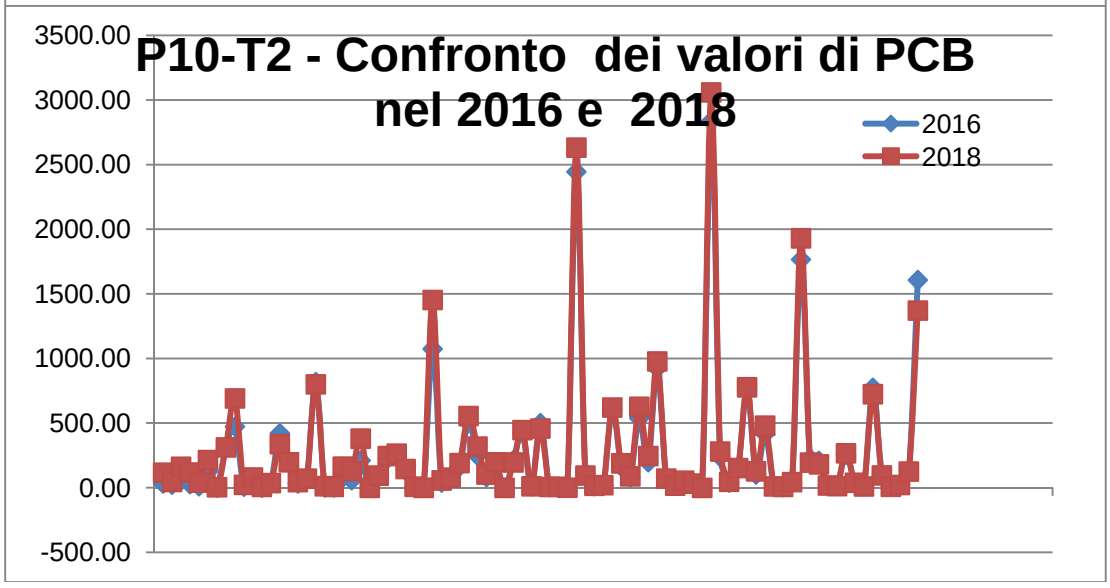

P5-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018


P6-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018


P7-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018


P8-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018


P9-T2 Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
201
6


P10-T2 - Confronto dei valori di PCB nel 2016 e 2018
3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
2016
2018