Università di Brescia

Metodi basati sugli effetti per acque reflue e acque destinate al consumo umano

Dalla caratterizzazione delle miscele di microinquinanti alla gestione strategica del rischio sanitario-ambientale

Roberta Pedrazzani – Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Industriale · MICROINQUINANTI 2026, Politecnico di Milano

07/10/2026

«The question today is not to protect the environment and human health from individual bad actors but from potentially harmful chemical cocktails»

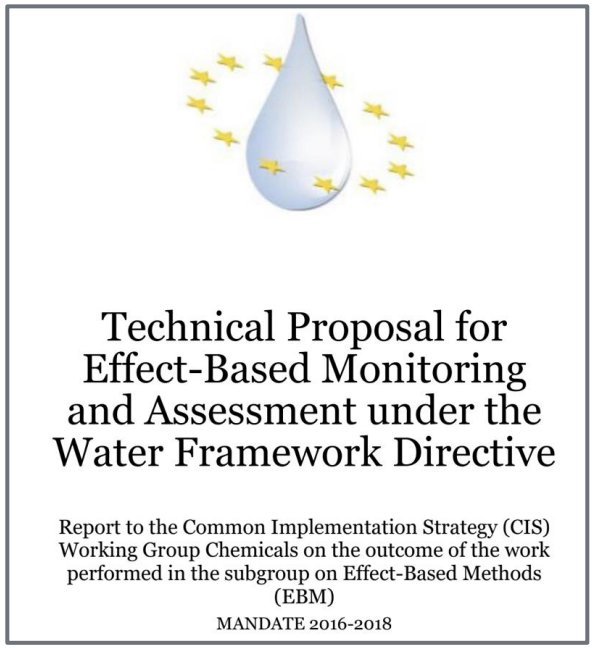
B.I. Escher, J.L.M. Hermens, J.P. Sumpter, G.T. Ankley – Environ. Sci. Technol. 60 (2026) 16410

Quadro normativo

Università di Brescia

01.

Il monitoraggio basato sugli effetti nella Direttiva quadro

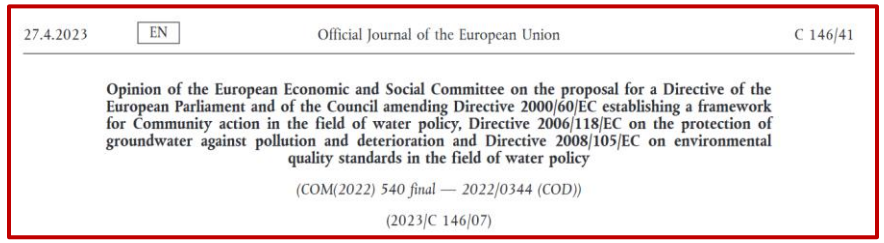


Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive

Report to the Common Implementation Strategy (CIS) Working Group Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on Effect-Based Methods (EBM)

MANDATE 2016-2018

2019 – proposta tecnica CIS

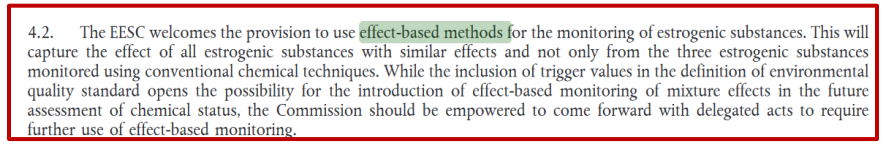


27.4.2023 EN Official Journal of the European Union C 146/41

Opinion of the European Economic and Social Committee on the proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy

(COM(2022) 540 final — 2022/0344 (COD))

(2023/C 146/07)



4.2. The EESC welcomes the provision to use effect-based methods for the monitoring of estrogenic substances. This will capture the effect of all estrogenic substances with similar effects and not only from the three estrogenic substances monitored using conventional chemical techniques. While the inclusion of trigger values in the definition of environmental quality standard opens the possibility for the introduction of effect-based monitoring of mixture effects in the future assessment of chemical status, the Commission should be empowered to come forward with delegated acts to require further use of effect-based monitoring.

2023 – parere del CESE sulla proposta

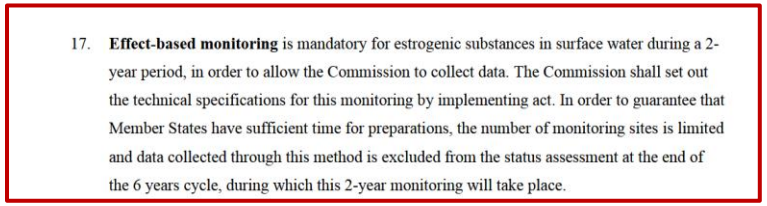


European Council
Council of the European Union
About the institutions · Topics · Meetings · News and media · Documents and research

Home > Press > Press releases

Council of the EU | Press release | 17 February 2026 10:00

Safeguarding water quality: Council signs off on stricter protection rules for surface water and groundwater



17. **Effect-based monitoring** is mandatory for estrogenic substances in surface water during a 2-year period, in order to allow the Commission to collect data. The Commission shall set out the technical specifications for this monitoring by implementing act. In order to guarantee that Member States have sufficient time for preparations, the number of monitoring sites is limited and data collected through this method is excluded from the status assessment at the end of the 6 years cycle, during which this 2-year monitoring will take place.

2026 – accordo del Consiglio

CIS WFD, Technical Proposal for Effect-Based Monitoring (2019); Parere CESE, GU C 146 del 27.4.2023, punto 4.2; Consiglio dell'UE, comunicato del 17.2.2026

Direttiva (UE) 2026/805: il valore soglia basato sugli effetti

Università di Brescia

Art. 2, punto 35a – «Valore soglia basato sugli effetti»

soglia per gli effetti di un inquinante o gruppo di inquinanti in acqua, sedimenti o biota, misurati con un metodo di monitoraggio basato sugli effetti appropriato e scientificamente validato, al di sopra della quale potrebbero verificarsi effetti negativi sulla salute umana o sull'ambiente

- Buono stato chimico: rispetto degli EQS e, ove disponibili, degli EBT (art. 2, punto 24)
- Monitoraggio dell'attività estrogena con metodi basati sugli effetti per due anni, in siti selezionati in cui si analizzano E1, E2 ed EE2 (considerando 23)
- Entro il 1° dicembre 2027: atto di esecuzione con le specifiche tecniche; relazione della Commissione sul confronto tra i due approcci e su un EBT per gli estrogeni a fini di screening
- Nei riesami successivi: possibile estensione ad altri effetti (es. genotossici, neurotossici), inizialmente in parallelo alla chimica

Dir. (UE) 2026/805, art. 1, punto 2 (art. 2, punti 24 e 35a, Dir. 2000/60/CE) e considerando 23; traduzione di lavoro dal testo inglese (GU L del 20.4.2026); ISS, Salute e ambiente – News, 3.9.2026

Direttiva (UE) 2024/3019 e metodi basati sugli effetti

Trattamento quaternario

- impianti ≥ 150 000 AE e impianti ≥ 10 000 AE in aree a rischio
- rimozione ≥ 80% della somma di sostanze indicatrici (allegato I, parte C)

Non coperti dal monitoraggio obbligatorio

- effetti delle miscele
- prodotti di trasformazione e sottoprodotti dei trattamenti ossidativi

Recital 37

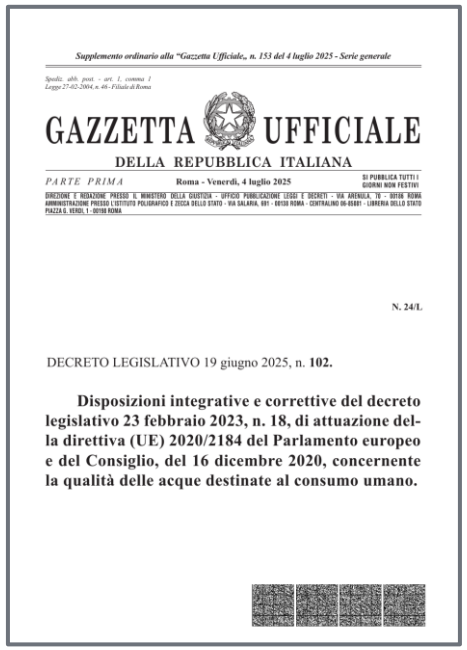
«The risk assessment could include a broad chemical screening, including chemical mixtures, or biological effect-based methods, or both […]»

«WWTPs may comply with UWWTD requirements while still discharging effluents with residual, or increased toxicity to receiving environments»

Santos et al. (2026)

Dir. (UE) 2024/3019, art. 8, allegato I parte C, rec. 37; Santos M.M., Barros S., Chaves R. et al. (2026), Needs and Opportunities for Biological Effect Monitoring in the Frame of the New EU Urban Wastewater Directive

Piani di Sicurezza dell'Acqua dopo il D.Lgs. 102/2025



Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale", n. 153 del 4 luglio 2025 - Serie generale

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA Roma - Venerdì, 4 luglio 2025

N. 24/L

DECRETO LEGISLATIVO 19 giugno 2025, n. **102.**

Disposizioni integrative e correttive del decreto legislativo 23 febbraio 2023, n. 18, di attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2020, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.



RAPPORTI ISTISAN 25|4

Linee guida per l'approvazione dei Piani di Sicurezza dell'Acqua per le forniture idropotabili

D. Mattei, V. Fuscoletti, C. Marchiafava, L. Lucentini e il Gruppo di lavoro "Linee guida per l'approvazione dei PSA"

AMBIENTE E SALUTE

- PSA per ogni sistema di fornitura entro il 12 gennaio 2029
- Approvazione del CeNSiA secondo le linee guida ISTISAN 25/4, richiamate «in toto» dall'allegato VI
- Riesame a intervalli non superiori a tre anni (prima sei)

RIQUADRO 2. Riesame periodico del PSA

Al fine di garantire che i cambiamenti e gli eventi che possono compromettere nel tempo l'efficace implementazione del PSA vengano valutati regolarmente e gestiti, il *team* di PSA deve programmare riunioni dedicate al riesame periodico del PSA. La frequenza di tali riunioni deve essere stabilita dal *team* e documentata attraverso l'emissione di verbali.

Il riesame periodico del PSA deve essere condotto dal *team* del PSA, includendo l'Alta direzione del sistema di gestione idropotabile, e con l'eventuale partecipazione di soggetti esterni al *team* in qualità di parti interessate.

Esso deve coprire, di norma, tutti gli aspetti del PSA (riesame periodico completo), prendendo in considerazione i seguenti *input*:

- lo stato delle azioni derivanti da precedenti riesami, anche straordinari (ove applicabile)
- i cambiamenti rilevanti per il sistema di fornitura idropotabile, laddove, per consistenza ed entità non comportino un riesame straordinario (ad esempio: cambiamenti introdotti a seguito dell'implementazione dei piani di miglioramento, revisione e/o introduzione di nuovi processi e procedure, variazioni dei membri del *team* di PSA, mutamenti nell'assetto organizzativo all'interno del sistema di fornitura idropotabile o dei soggetti esterni, aggiornamenti tecnico-scientifici su parametri già ricercati o emergenti, nuovi requisiti normativi che hanno un impatto sulla gestione del sistema di fornitura idropotabile e sulla valutazione della qualità e sicurezza dell'acqua, modifiche sostanziali nella filiera idropotabile apportate a seguito di pianificazione, nuove attività o interventi nelle aree di alimentazione per i punti di prelievo)
- le informazioni sulle prestazioni ed efficacia del PSA (ad esempio: le analisi dei dati relativi ai controlli interni ed esterni, i risultati del monitoraggio operativo, le non conformità e azioni correttive, i risultati di audit interni, le prestazioni dei fornitori esterni, la rivalutazione dei rischi e delle azioni di miglioramento, le valutazioni da parte di organismi esterni, il grado di raggiungimento degli obiettivi del PSA)
- le proiezioni climatiche e le valutazioni connesse agli impatti dei cambiamenti climatici

Tra gli input del riesame: «aggiornamenti tecnico-scientifici su parametri già ricercati o emergenti» e le proiezioni climatiche

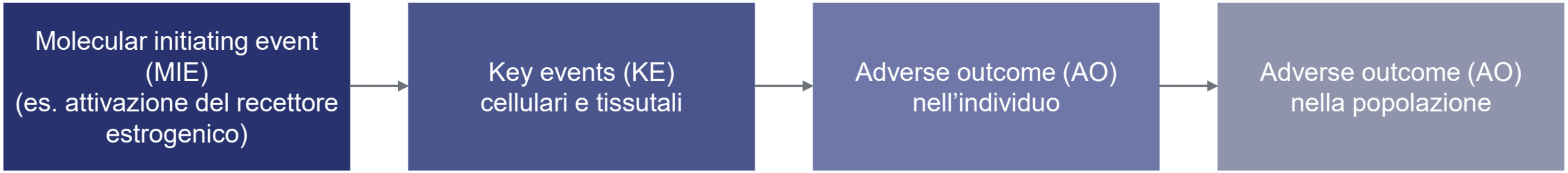
D.Lgs. 18/2023, artt. 6, 7 e 20; D.Lgs. 102/2025, art. 5 e allegato VI (GU S.O. n. 24/L del 4.7.2025); ISS, Rapporti ISTISAN 25/4, Step 10, riquadro 2, p. 17

Metodi basati sugli effetti

Università di Brescia

02.

Adverse Outcome Pathway (AOP)



- Sostanze con lo stesso modo d'azione agiscono in modo additivo sulla concentrazione, anche a concentrazioni basse e realistiche: il saggio misura questa somma
- Recettori conservati tra i vertebrati: lo stesso dato serve alla protezione degli ecosistemi e della salute umana
- I sostituti con lo stesso meccanismo (es. bisfenoli alternativi al BPA) sono intercettati anche se assenti dagli elenchi di sostanze

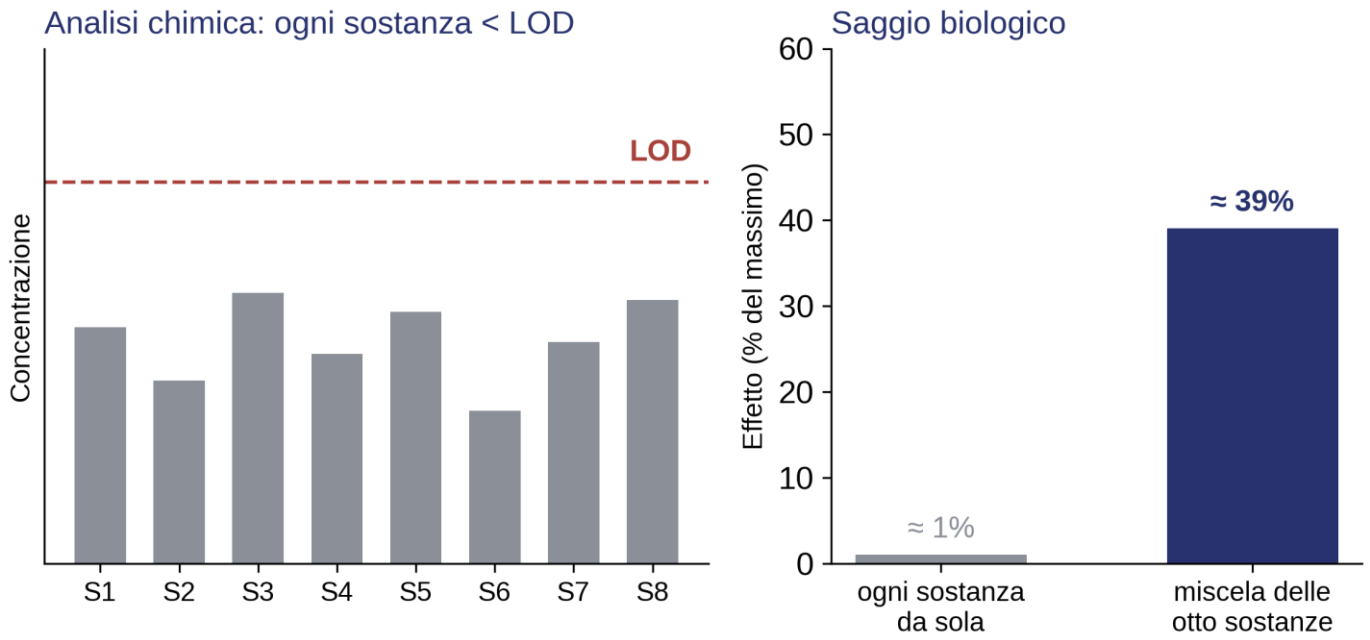
Escher B.I., Hermens J.L.M., Sumpter J.P., Ankley G.T., Environ. Sci. Technol. 60 (2026) 16410

Analisi chimica mirata e metodi basati sugli effetti

	Analisi chimica mirata	Metodi basati sugli effetti
Grandezza misurata	Concentrazione di sostanze selezionate	Effetto della miscela su un modo d'azione
Sostanze non ricercate, metaboliti, prodotti di trasformazione	Non rilevati	Inclusi, se attivi sul bersaglio
Interazioni tra sostanze	Stimate per calcolo (additività)	Integrate nella risposta misurata
Identità del responsabile	Nota	Richiede analisi chimica successiva

LE2C – GdL Microinquinanti Emergenti (2025), cap. 3; Neale et al., Environ. Sci. Technol. 57 (2023) 6023–6032

Something from nothing: effetti di miscela sotto il LOD

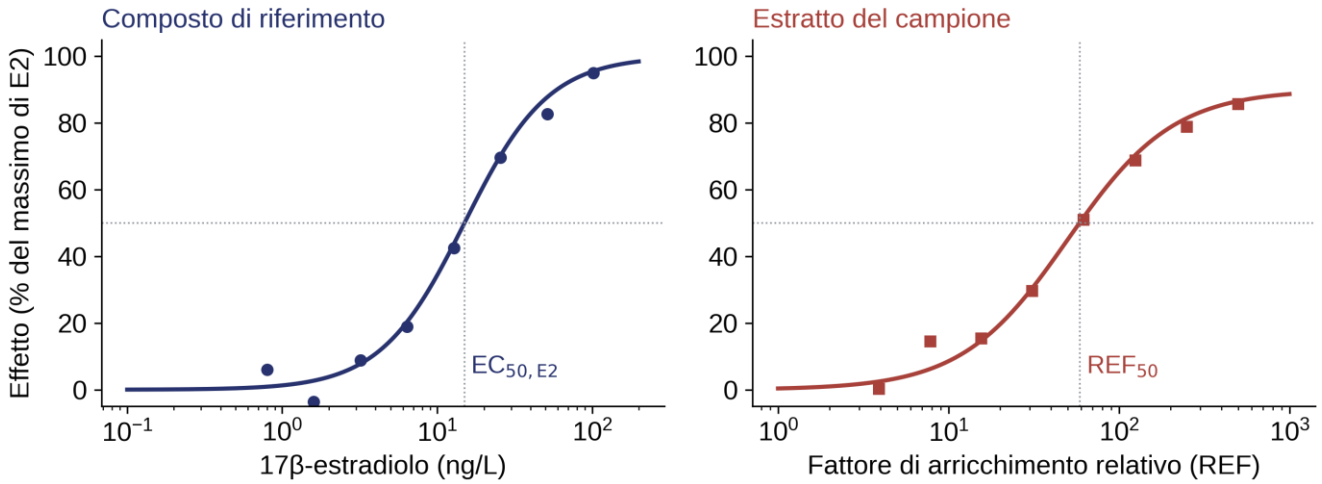


- Sostanze ciascuna sotto la propria NOEC: la miscela produce un effetto significativo
- Nell'acqua: molte sostanze sotto il LOD in chimica, effetto misurabile nel saggio sull'estratto

Un esito chimico «tutto < LOD» non esclude un effetto della miscela

Schema illustrativo, non dati sperimentali: modello di addizione delle concentrazioni, 8 sostanze ciascuna a 1/10 della propria EC50. Concetto: Silva et al., Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1751–1756

Equivalente biologico e quoziente di rischio



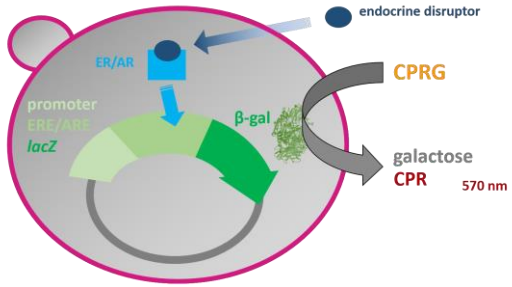
Saggi su lievito ricombinante, laboratorio UNIBS

Attività	Sostanza di riferimento	Equivalente
Estrogenica	17β-estradiolo	EEQ
Androgenica	5α-diidrotestosterone	DHTEQ
Progestinica	progesterone	PEQ
Glucocorticoide	corticosterone	CSEQ
Mineralcorticoide	cortisolo	CLEQ
Tiroidea	triiodotironina	T3EQ
Arilica (AhR)	β-naftoflavone	NEQ

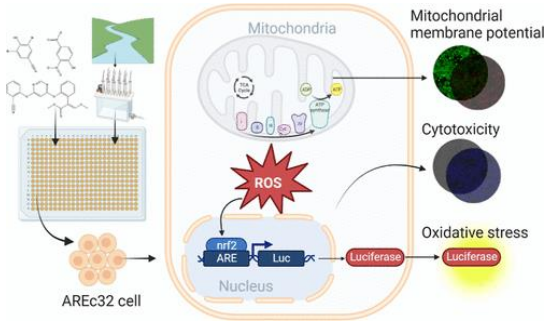
$EEQ = EC_{50,E2} / REF_{50}$ $RQ = EEQ / EBT$ RQ ≥ 1: indicazione di rischio

Curve illustrative. Calcolo secondo ISO 23196:2022; Escher et al., Sci. Total Environ. 628 (2018) 748–765; ISO 19040-2:2018; relazioni di ricerca UNIBS (2024)

Batteria di saggi applicata da UNIBS



Attivazione recettoriale su lievito ricombinante: attività estrogena, androgena, progestinica, glucocorticoide, mineralcorticoide, tiroidea, arilica



Stress ossidativo e tossicità mitocondriale (MitoOxTox, cellule AREc32)

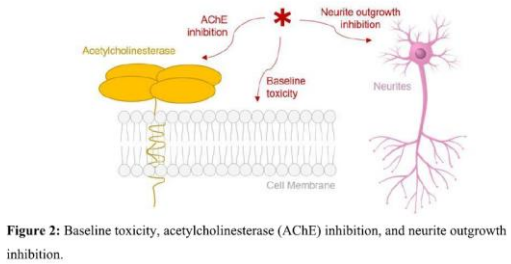
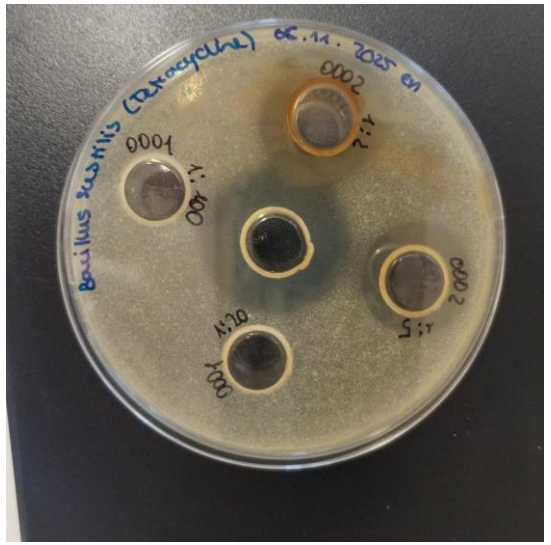


Figure 2: Baseline toxicity, acetylcholinesterase (AChE) inhibition, and neurite outgrowth inhibition.

Neurotossicità su cellule SH-SY5Y



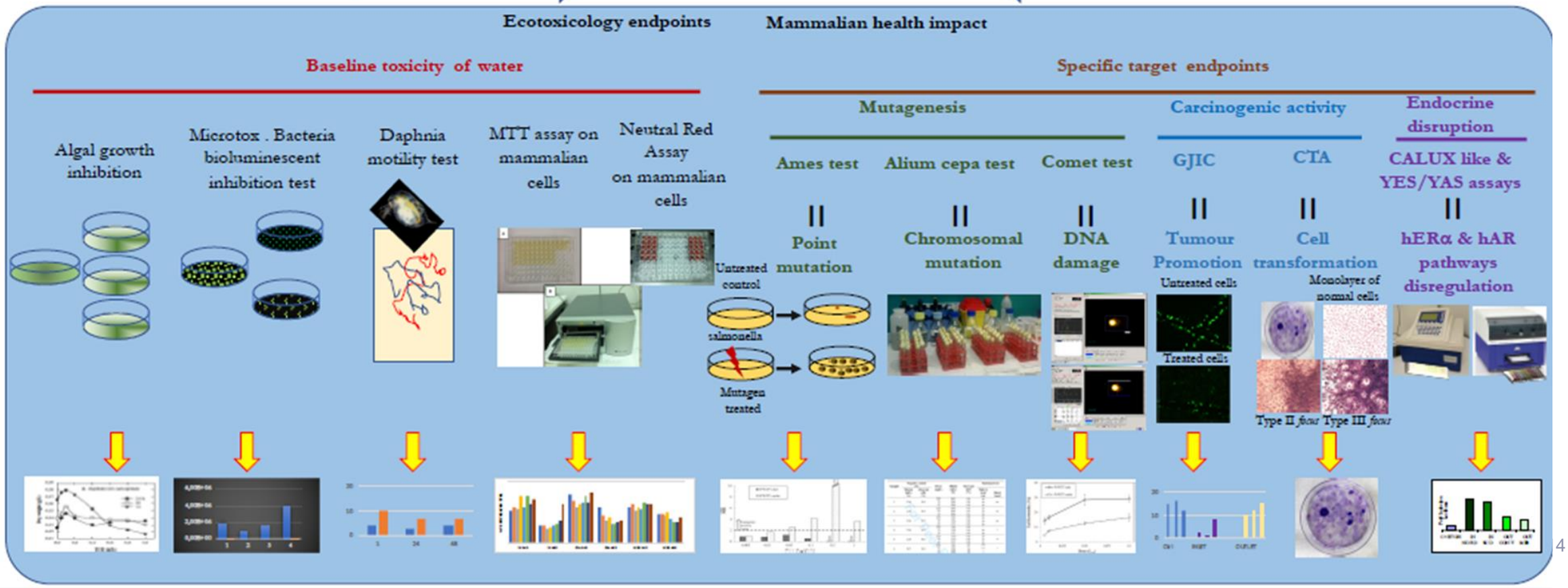
Attività antibiotica: aminoglicosidi, tetracicline, chinoloni, macrolidi

Completano la batteria: test di Ames, Aliivibrio fischeri, Daphnia magna, fitotossicità su mono- e dicotiledoni, saggi quasi-in-vivo

ISO 19040-1 e -2:2018; saggi MitoOxTox e neurotossicità in collaborazione con UFZ Lipsia

Dal campione ai saggi: il protocollo UNIBS



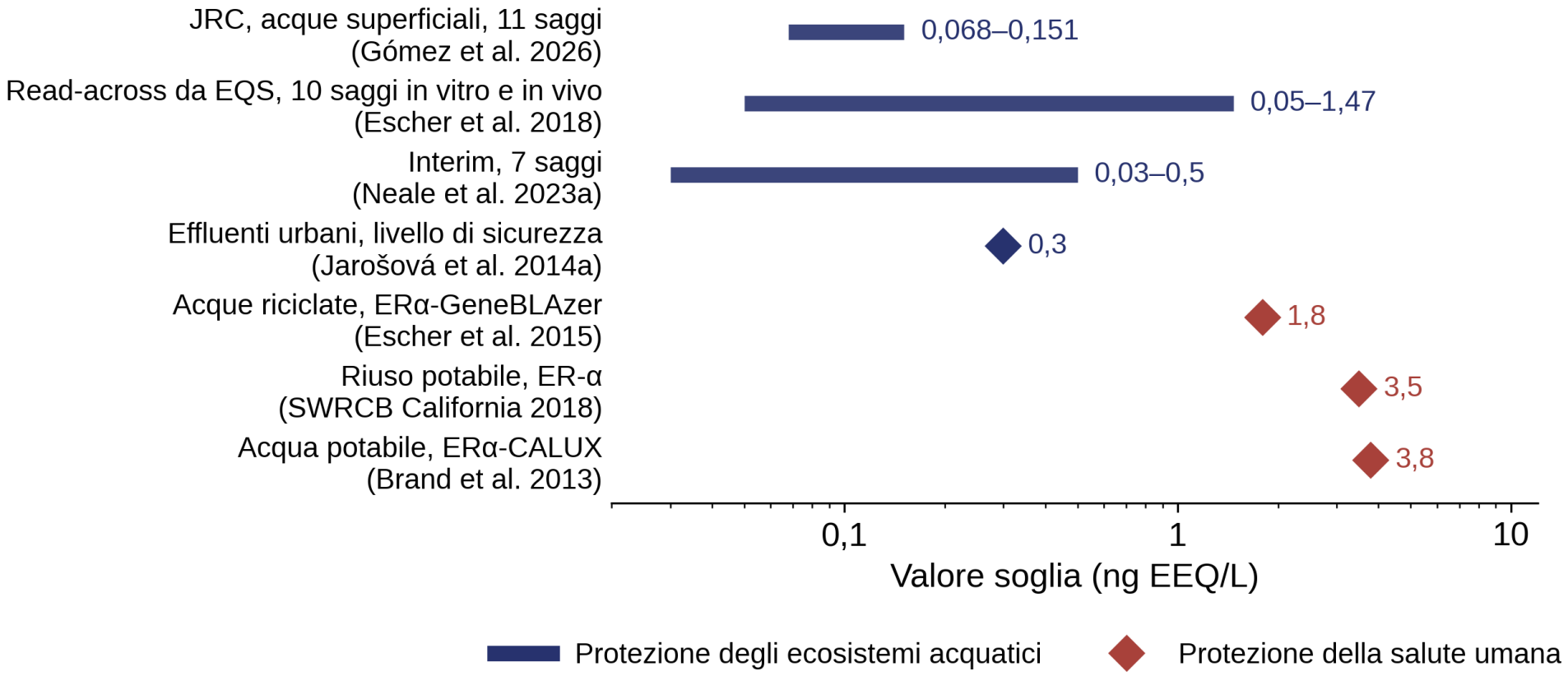


Valori soglia basati sugli effetti

Università di Brescia

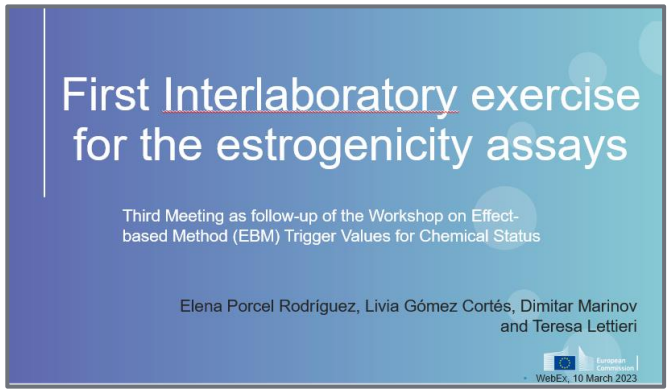
03.

Valori soglia per l’attività estrogena a confronto



Gómez et al. 2026; Escher et al. 2015, 2018; Neale et al. 2023a; Jarošová et al. 2014a; SWRCB 2018; Brand et al. 2013

Circuito interlaboratorio JRC sull'attività estrogena



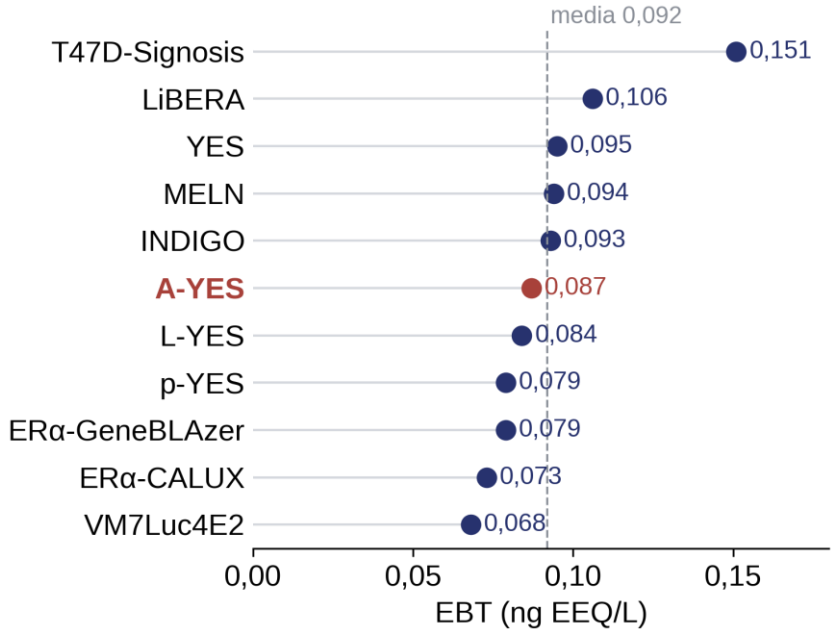


18 laboratori (14 con saggi, 4 con analisi chimica), 12 saggi, 8 siti fluviali dell'Italia settentrionale (2023)

Attività estrogena rilevata da tutti i saggi nei campioni reali

Estrone e bisfenolo A principali determinanti del rischio stimato per via chimica

Partecipazione UniBS con A-YES (ISO 19040-2)



Gómez et al., Environmental Research (2026) 124218. EBT secondo l'opzione 1 (derivazione dagli EQS, Escher et al. 2018)

Che cosa fare se l’effetto di un campione supera l’EBT?

Risposta al superamento dell'EBT: saggi di categoria 1 e 2

Università di Brescia

Livello 1: saggi biologici su tutti i campioni

BEQ ≥ EBT: controllo di qualità e ripetizione della misura

Categoria 1: pochi composti potenti spiegano l'effetto
(attività estrogena e glucocorticoide, inibizione del fotosistema II)

Analisi chimica mirata dei composti attesi
e confronto con i valori guida

Categoria 2: molti composti a bassa potenza
(AhR, stress ossidativo, PPARγ, tossicità batterica)

Verifica della citotossicità (EBT IC10: REF 10)

BEQ > 10 × EBT: endpoint aggiuntivi e consultazione dell'autorità
altrimenti: monitoraggio più frequente

Neale et al., Environ. Toxicol. Chem. 42 (2023) 714–726; Neale et al., Water Reuse 16 (2026) 320; Escher e Neale, Environ. Toxicol. Chem. 40 (2021) 487–499

Esperienze applicative e caso di studio

Università di Brescia

04.

Applicazioni su casi reali nel mondo



Dagli scarichi industriali al riuso potabile: i saggi biologici sono già usati per decidere

1. **Unione europea** Dir. 2026/805: monitoraggio obbligatorio dell'attività estrogena
2. **Germania** Limiti di tossicità per gli scarichi dell'industria chimica
3. **Svizzera** Saggi biologici per verificare l'ozonazione; Neugut: effetti −66÷93%
4. **Francia** AQUAREF: monitoraggio prospettico in 20 siti
5. **Paesi Bassi** EBT per l'acqua potabile; strategia a livelli con i gestori
6. **California** Riuso potabile: screening obbligatorio estrogenico e AhR
7. **Sudafrica** Saggi proposti per il monitoraggio delle acque
8. **Queensland** Un anno di monitoraggio con EBT nel riuso potabile

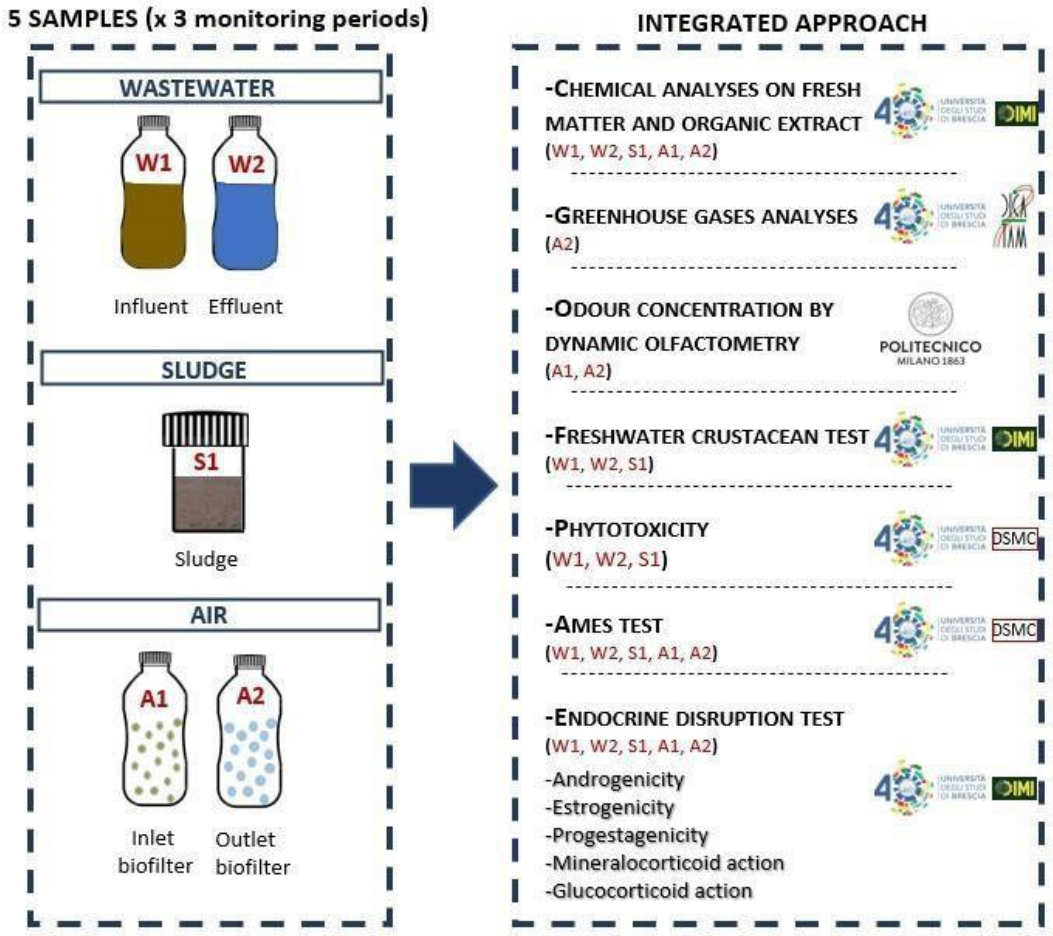
Dir. (UE) 2026/805; UBA (2025); VSA (2020); Kienle et al. 2022; Aït-Aïssa et al., AQUAREF (2020); Brand et al. 2013; KWR; SWRCB (2018, 2026); Kruger et al., Environ. Sci. Pollut. Res. 29 (2022) 84049; Neale et al., Water Reuse 16 (2026) 320

Esperienze UNIBS negli impianti di depurazione

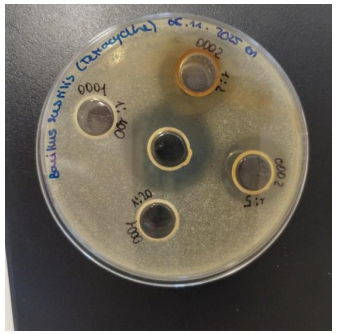
Trattamento	Esito	Riferimento
Fanghi attivi (CAS) e bioreattore a membrane (MBR)	Rimozione di NP e BPA simile; attività estrogena rimossa in misura maggiore dall'MBR	Bertanza et al. 2011
Ozonazione terziaria, impianto pilota (12 e 20 mg O_3/L)	Stessa riduzione dell'attività estrogena; dose più alta più efficace su NP e BPA	Bertanza et al. 2011
Ozonazione terziaria a scala reale, 140 000 AE, reflui domestici e tessili	Attività estrogena ridotta in media del 20% circa; mutagenicità senza variazioni marcate	Bertanza et al. 2013
Ozonazione: danno sanitario (acqua e aria) stimato dai risultati dei saggi	Danno complessivo ridotto con dose moderata (10 mg O_3/L), aumentato con dose elevata (20 mg O_3/L) per i consumi energetici	Papa et al. 2013
Analisi del ciclo di vita	Effetto convertito in concentrazione equivalente di sostanze modello	Menghini et al. 2023

Bertanza et al., Water Res. 45 (2011) 2473–2484; Bertanza et al., Sci. Total Environ. 458–460 (2013) 160–168; Papa, Pedrazzani, Bertanza, Water Res. 47 (2013) 3679–3687; Menghini et al., Water 15 (2023) 960

Caso di studio: impianto di depurazione delle acque reflue



- Tre campagne di monitoraggio
- Influente, effluente, fango disidratato, aria in ingresso e in uscita dal biofiltro
- Analisi chimiche, saggi ecotossicologici, interferenza endocrina, mutagenicità, fitotossicità, attività antibiotica
- **Obiettivo: seguire dove gli effetti si trasferiscono (effluente, fango, aria), non solo quanto se ne rimuove**



Attività antibiotica su Bacillus subtilis (tetracicline)

Progetto di ricerca PRIN 2022

Interpretazione rispetto alle condizioni di esposizione

Matrice	Riferimento per la valutazione
Effluente	Rapporto di diluizione nel corpo idrico ricettore compatibile con il buono stato di qualità
Fango destinato all'agricoltura	Dose di applicazione al suolo definita dai limiti sull'azoto e dalle pratiche agronomiche

In assenza di EBT

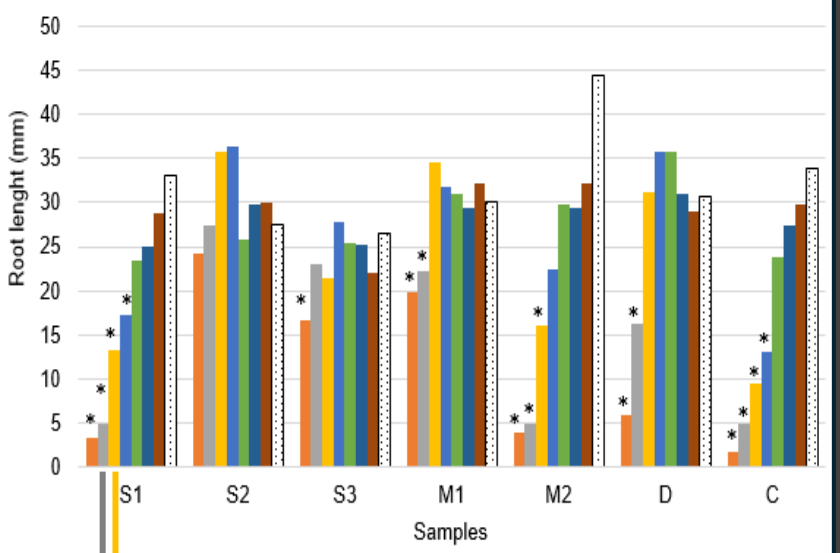
- Confronto con situazioni di riferimento ritenute accettabili
- Conversione dell'effetto in concentrazione equivalente di sostanze modello, per l'analisi del ciclo di vita

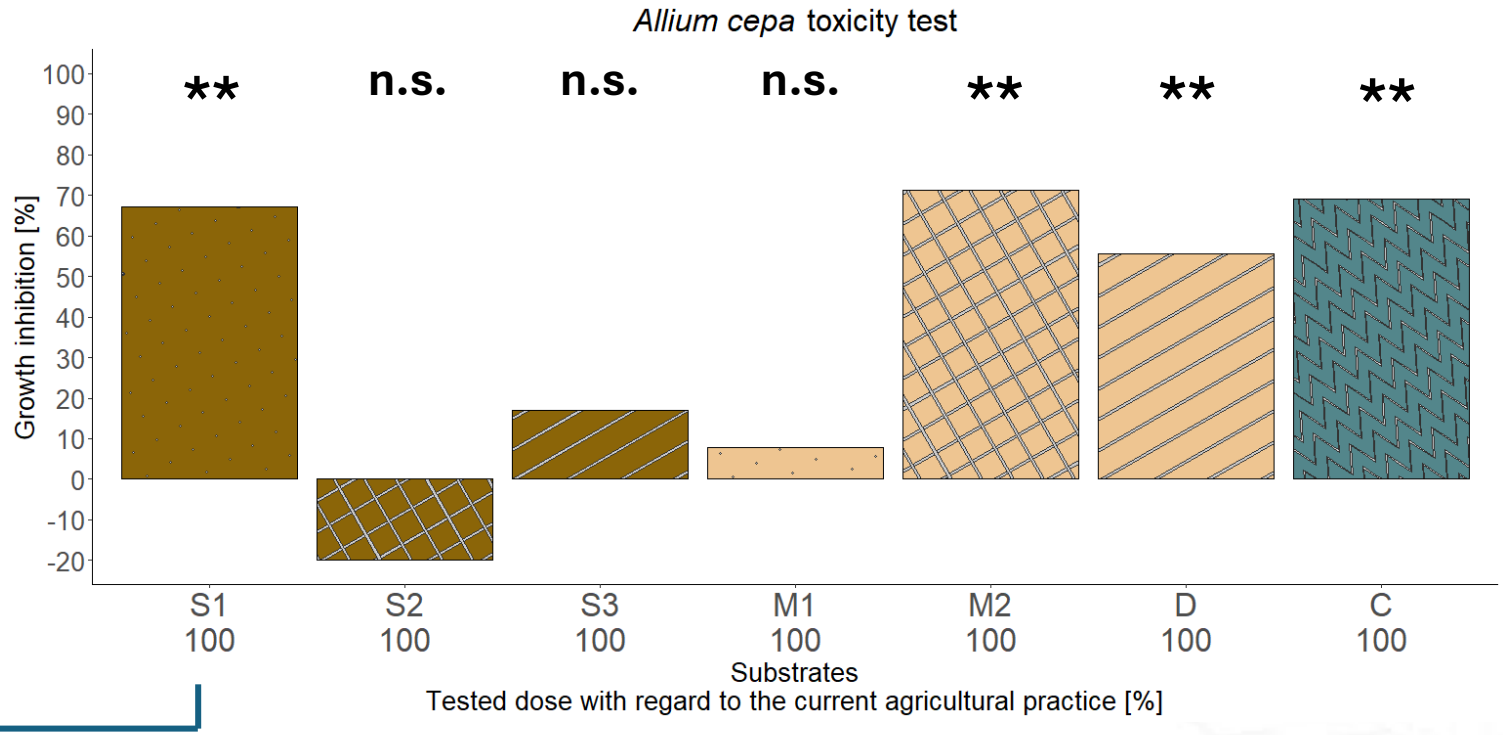
LE2C (2025), § 3.4.1; Bertanza et al., MethodsX 12 (2024) 102599; Menghini et al., Water 15 (2023) 960

AQUEOUS EXTRACTS

BEFORE

AFTER





UNIVERSITY OF BRESCIA

Fonti idropotabili: monitoraggio integrato

Obiettivo	Monitoraggio integrato chimico-tossicologico
Committenti	Due gestori del servizio idrico integrato
Fonti	20 (pozzi e prese di centrale), 2 campagne nel 2023
Pretrattamento	SPE automatizzata su HLB (GX-274 ASPEC), fino a 10 L; C18 per il test di Ames
Saggi	Ames TA98 e TA100 ±S9; 6 attività recettoriali su lievito (ISO 19040-2); MitoOxTox e neurotossicità (UFZ Lipsia)
Chimica	Analisi target e non-target sugli stessi campioni





Impiego nel Piano di Sicurezza dell'Acqua

- Caratterizzazione della fonte
- Verifica dei trattamenti, inclusi i sottoprodotti
- Sorveglianza dopo eventi estremi e siccità, che mobilizzano contaminanti
- Individuazione di pericoli non ancora normati

Lettura dei risultati secondo lo schema BEQ/EBT

Relazioni di ricerca (2024), riservate; Neale et al., J. Water Health 20 (2022) 1721–1732; WHO/UNECE (2024)

Conclusioni

Università di Brescia

1. I metodi basati sugli effetti, ancorati agli Adverse Outcome Pathway (AOP), integrano l'analisi chimica mirata e sono efficaci soprattutto come screening iniziale delle miscele.
2. L'EBT rende il saggio uno strumento di gestione: è specifico per saggio e per obiettivo di protezione; per l'attività estrogena i valori proposti variano di circa due ordini di grandezza.
3. La Dir. (UE) 2026/805 definisce gli EBT; la Dir. (UE) 2024/3019 cita i metodi basati sugli effetti solo nel considerando 37; la normativa italiana sulle acque destinate al consumo umano non li nomina, ma il PSA e le linee guida ISS ne offrono già la logica.
4. Negli impianti di depurazione delle acque reflue la batteria va applicata a tutte le matrici, fango compreso, e ai trattamenti quaternari, per verificare che non generino sottoprodotti più tossici.
5. Sulle fonti idropotabili la batteria ha confermato la qualità indicata dalla chimica e isolato i pochi casi da approfondire; servono EBT per altri modi d'azione e per le acque destinate al consumo umano.
6. Da ultimo: la progettazione Safe and Sustainable by Design, che usa anche QSAR e modelli predittivi, funziona per le singole sostanze, non per le miscele che si formano nelle acque: per queste serve misurare gli effetti.

I gestori del servizio idrico usano già i saggi biologici nei Piani di Sicurezza dell’Acqua?

Università di Brescia