

Convegno

MICRO INQUINANTI 2026

*Testimonianze, soluzioni e
prospettive per il
Servizio Idrico Integrato*

**Prospettive per il
monitoraggio e la valutazione
del rischio chimico nei servizi
idrici integrati alla luce delle
recenti Direttive Europee**



Stefano Polesello
Istituto di Ricerca sulle Acque IRSA-CNR
polesello@irsa.cnr.it



Il monitoraggio chimico delle acque:

- ▶ **Direttiva (UE) 2026/805 (WFD-EQS):** 70 sostanze prioritarie o gruppi di sostanze (anche Pesticidi totali) e $\simeq$ 20 nella *Watch List*
- ▶ **Direttiva (UE) 2020/2184** per le acque potabili: $\simeq$ 33 parametri (alcuni come famiglia: antiparassitari, PFAS)



Come facciamo ad assicurare che se i parametri **target** sono inferiori ai limiti, non vi è alcun rischio?

Siamo sicuri che stiamo monitorando le molecole giuste? Quali sono le molecole giuste?

Quelle che sono presenti in quantità superiori? Che hanno maggiori effetti tossici?

Il problema dal punto di vista delle Direttive UE

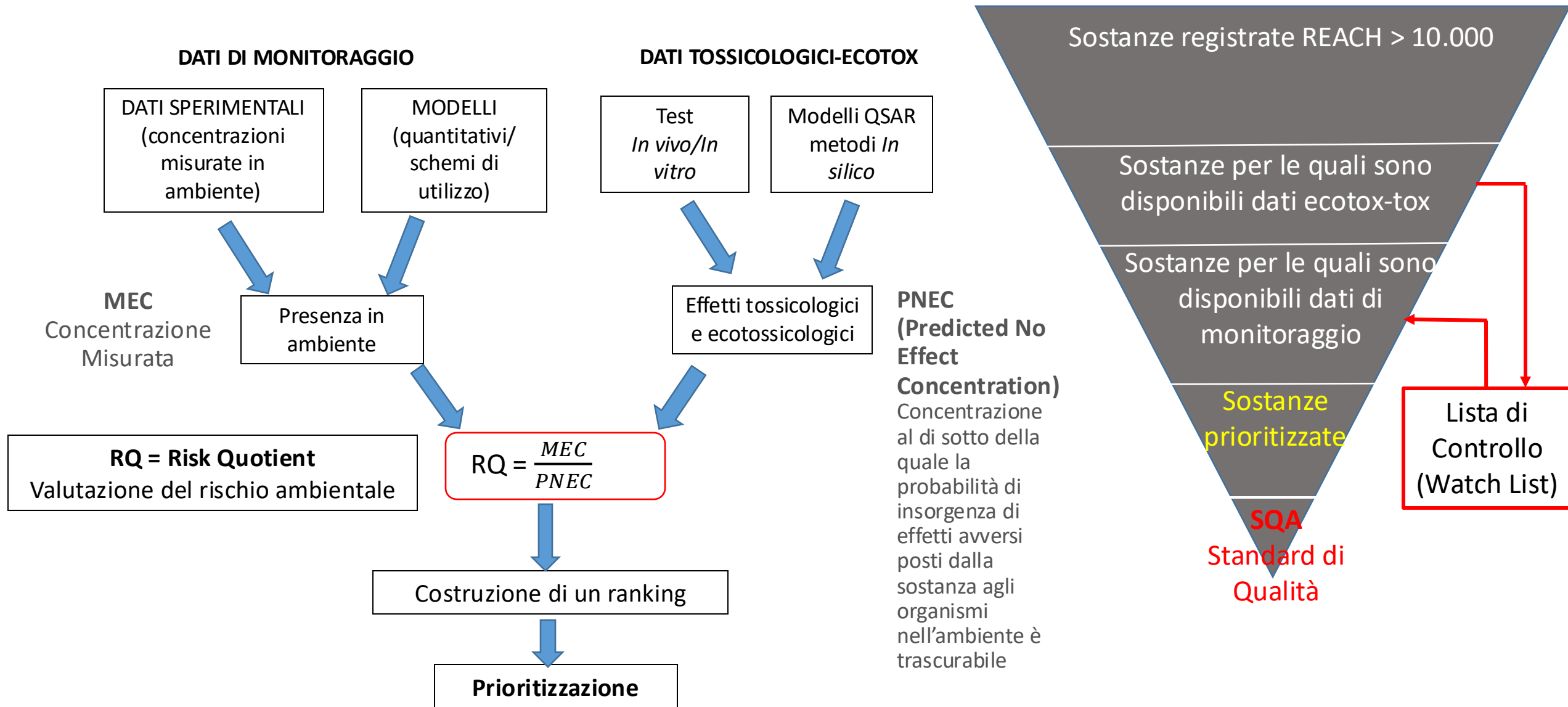
Direttiva (UE) 2020/2184

- Per proteggere la salute umana è necessario fissare **a livello di Unione prescrizioni minime** che tutte le acque destinate a tal fine dovrebbero soddisfare.
- Occorre inoltre che gli **Stati membri** adottino tutte le disposizioni necessarie a garantire che le acque destinate al consumo umano non contengano microrganismi e parassiti, **né altre sostanze** che, a seconda delle quantità o concentrazioni, in alcuni casi, possono rappresentare **un potenziale pericolo per la salute umana**, e che soddisfino le prescrizioni minime

Direttiva (UE) 2024/3019

- (45) Per garantire la protezione dell'ambiente e l'adozione di misure adeguate nell'ambito di qualsiasi **valutazione del rischio** da effettuare per l'attuazione della presente direttiva e di altre normative dell'Unione, gli **Stati membri dovrebbero monitorare un'ampia gamma di inquinanti** ai punti di ingresso e ai punti di scarico degli impianti di trattamento delle acque reflue urbane. Per evitare oneri inutili, **dovrebbero essere monitorati solo gli inquinanti che si prevede possano essere presenti nelle acque reflue urbane, tenendo conto dell'ampia varietà di inquinanti** che potrebbero raggiungere gli impianti di trattamento delle acque reflue urbane, anche provenienti da fonti di acque reflue non domestiche.

La prioritizzazione delle sostanze pericolose nella WFD

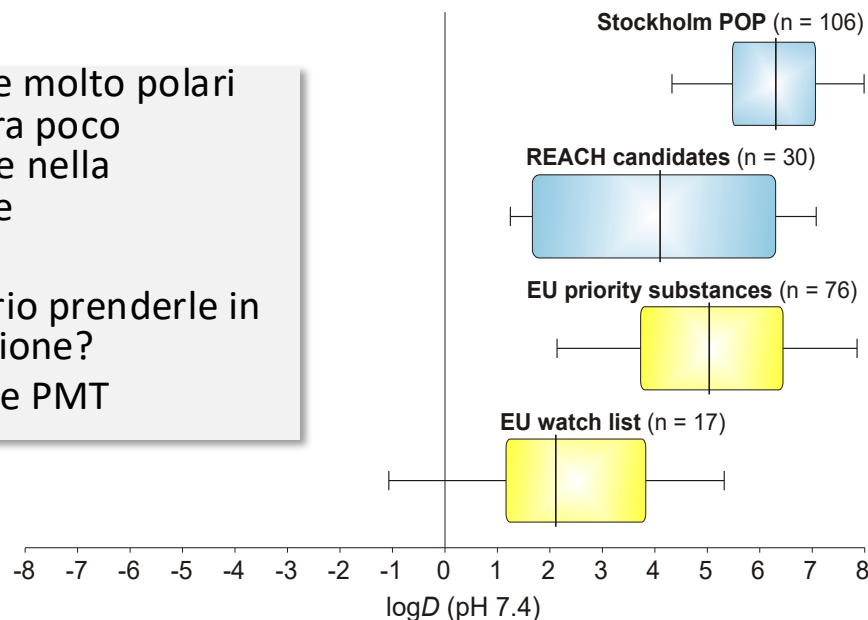


Il GAP regolatorio:

$\text{Log}D$ (=LogKow per le sostanze ionizzabili)

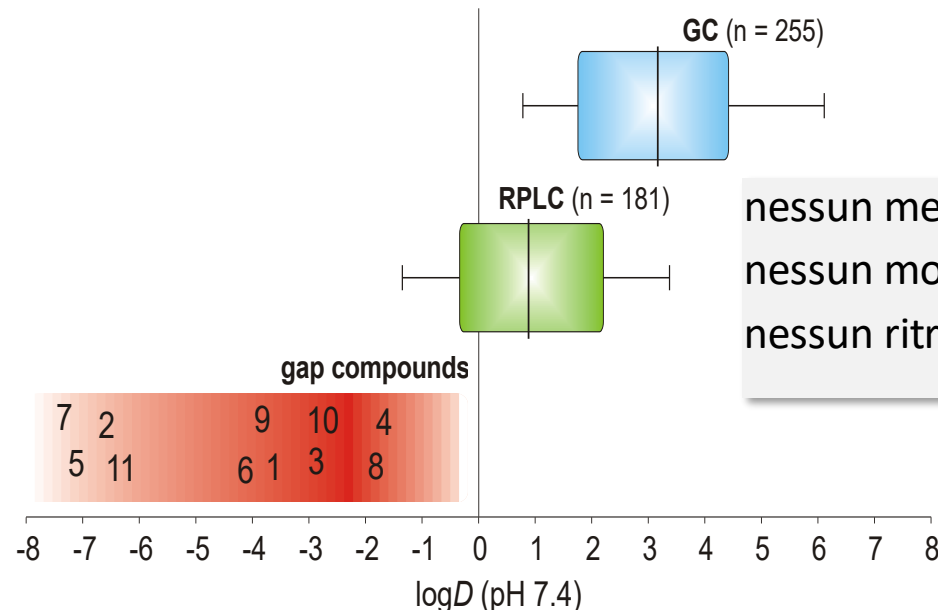
Le sostanze molto polari
sono ancora poco
considerate nella
legislazione

E' necessario prenderle in
considerazione?
Le molecole PMT



REACH candidates of SVHC, REACH, Article 57, d – f;
Priority substances according to Water Framework Directive (WFD);
Watch list of the WFD
Reemtsma et al. (2016) Environ. Sci. Technol. 50, 10308

Il GAP analitico:



nessun metodo analitico
nessun monitoraggio
nessun ritrovamento

GC-MS: EPA methods 8270 D and 8290 A
LC-MS: Schymanski et al. (2014) Environ. Sci. Technol. 48, 1811-1818.
1: Aminomethylphosphonic acid (AMPA), 2: Paraquat, 3: Cyanuric acid, 4: DMS, 5: Diquat,
6: 5-Fluorouracil, 7: Glyphosate, 8: Melamine, 9: Metformin, 10: Perfluoroacetic acid, 11: EDTA
Reemtsma et al. (2016) Environ. Sci. Technol. 50, 10308

Le nuove tecniche di screening

- a) Tecniche analitiche: Possibilità di determinare molte più sostanze contemporaneamente
- b) Test biologici: Possibilità di valutare un effetto tossico integrato di miscela

L'analisi di screening in spettrometria di massa HRMS

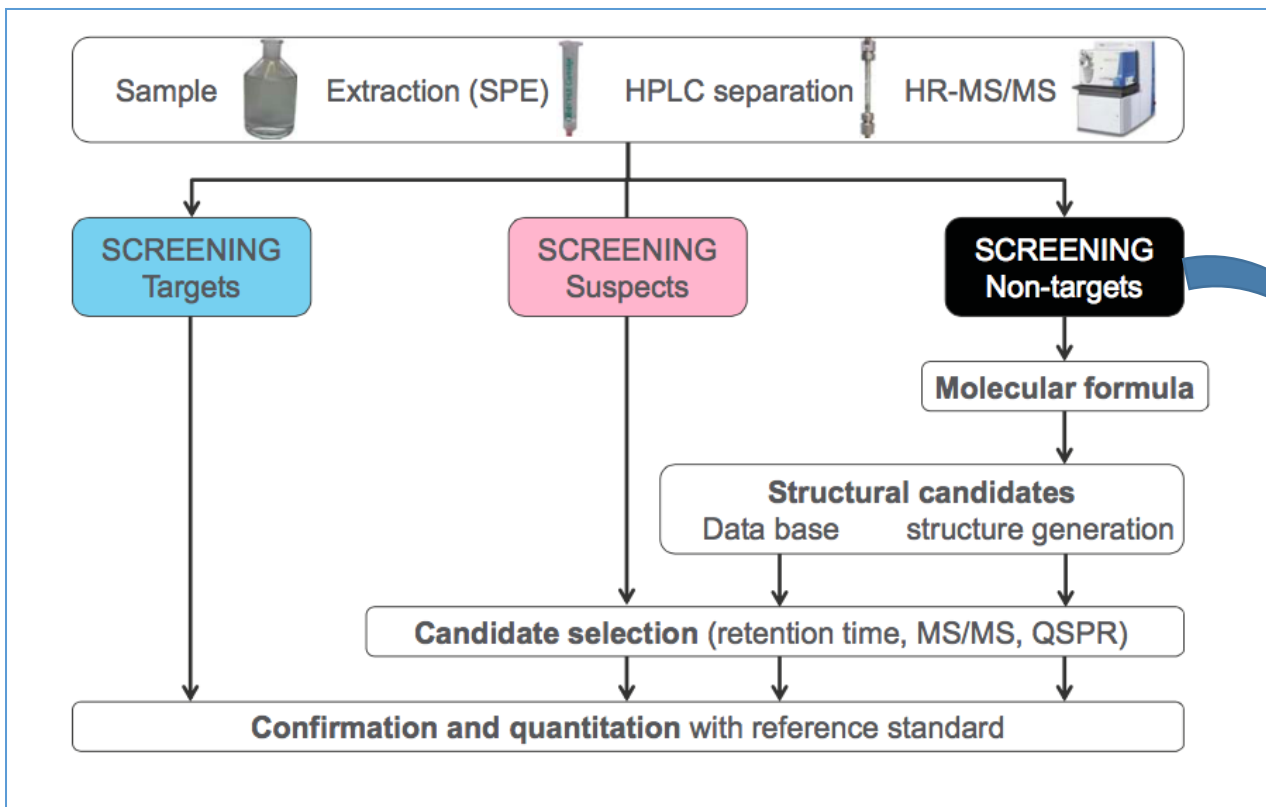
Le *Feature* spettrali

Massa molecolare
accurata ad elevata
risoluzione

Composizione
isotopica

Frammentazione in
Spettro di massa

Tempo di ritenzione
previsto da modello



TARGET:

Lista di composti avendo
a disposizione STDs



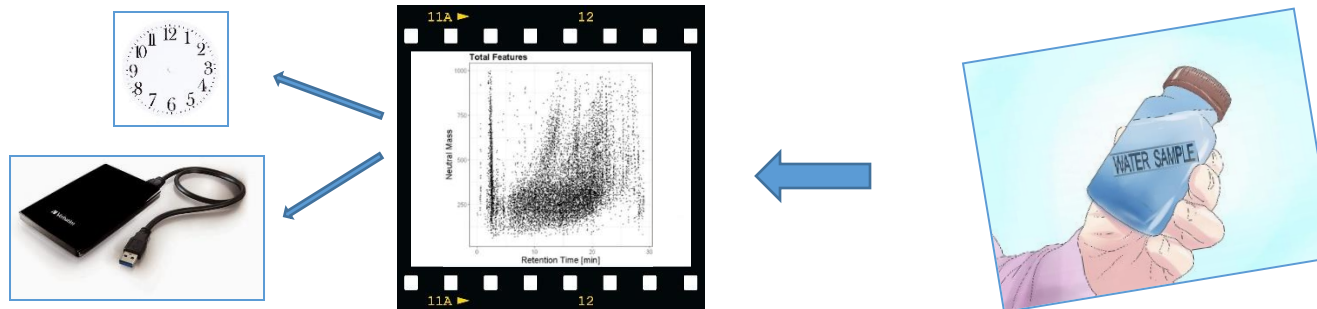
SUSPECT:

Lista predefinita di
composti di cui è nota
la massa ma non si
hanno STDs



NON-TARGET:

Si cercano composti
senza avere nessuna
informazione



Obiettivi dello screening

- Fornire agli enti gestori un modello che renda più semplice e ad ampio spettro la ricerca di contaminanti emergenti non soggetti ad analisi target:



affiancare l'analisi TARGET di routine ad una NON-TARGET/SCREENING

- Applicare questo mezzo a campioni di acque potabili, anche nell'ottica del *Water Safety Plan*:



da un approccio MITIGATIVO ad uno PREVENTIVO

- Mappare il territorio e comparare le serie di dati sulla base della sorgente (acque di falda o acque superficiali) e dell'area di studio legata a fattori antropici diversi:



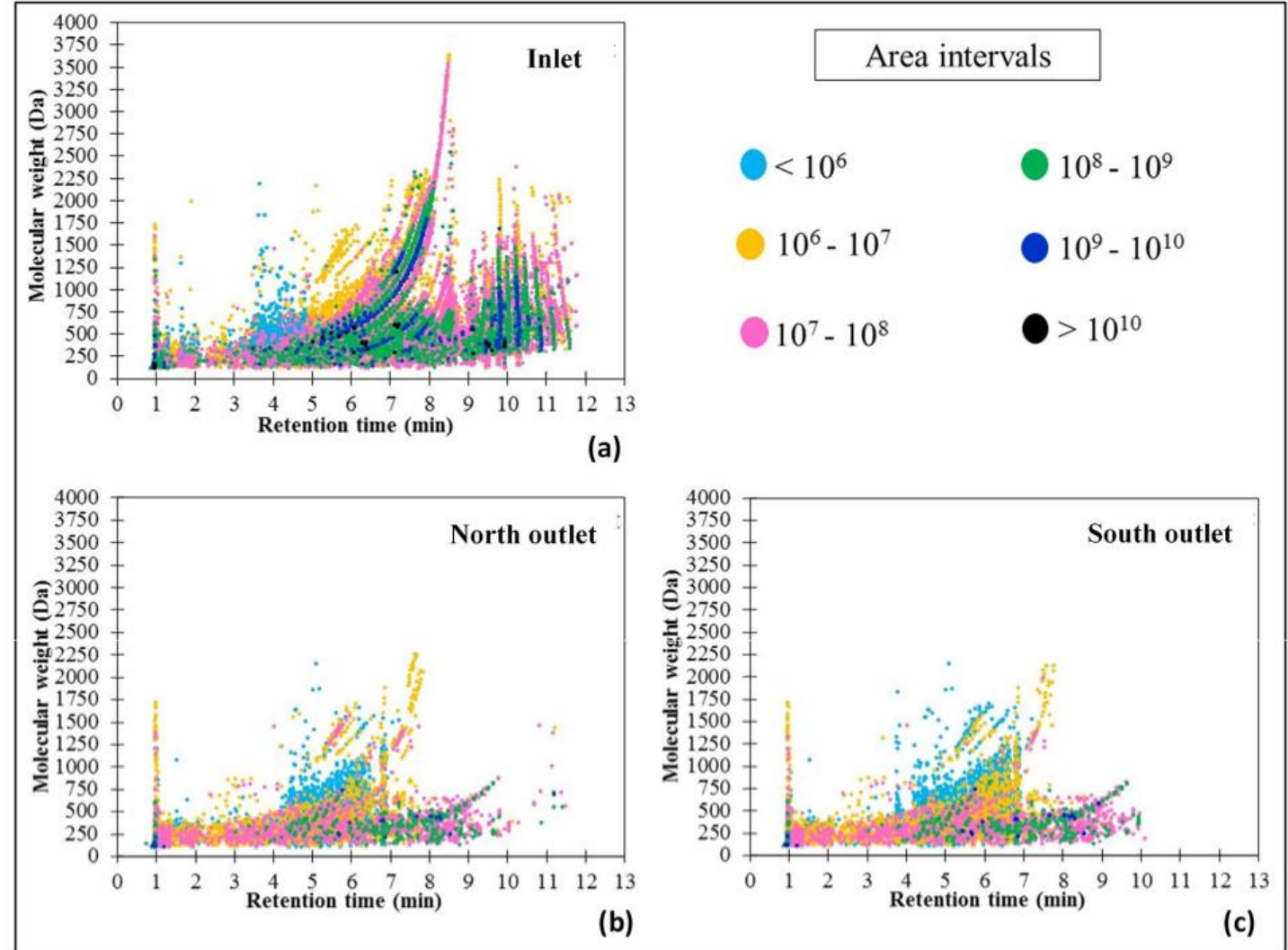
studio della distribuzione dei contaminanti sul territorio e delle possibili sorgenti

- Archiviazione delle analisi come **DIGITAL ENVIRONMENTAL SPECIMEN BANK** per una ricostruzione retrospettiva dell'evoluzione dei fenomeni di inquinamento

Il concetto di FEATURE e la rimozione negli impianti di trattamento

Il confronto dei profili chimici dei flussi in entrata e in uscita (effluente) di un impianto di trattamento delle acque reflue possono essere caratterizzate tramite la **spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS)** in grado di rilevare migliaia di segnali chimici distintivi (*Features*), può valutare l'efficienza di trattamento di un impianto confrontando i *fingerprint* HRMS :

- **Riduzione del segnale:** Il numero di caratteristiche rilevate diminuisce drasticamente dall'ingresso all'uscita.
- **Cambiamento delle proprietà fisico-chimiche:** Le molecole che sopravvivono ai trattamenti sono generalmente **più piccole, più polari** e presenti con intensità di segnale molto.
- **Composizione elementare:** le caratteristiche persistenti ed emergenti dell'effluente appartengono spesso a specifici gruppi elementari, dominati principalmente da combinazioni di **C, H, N, O** e C, H, N, O, P.



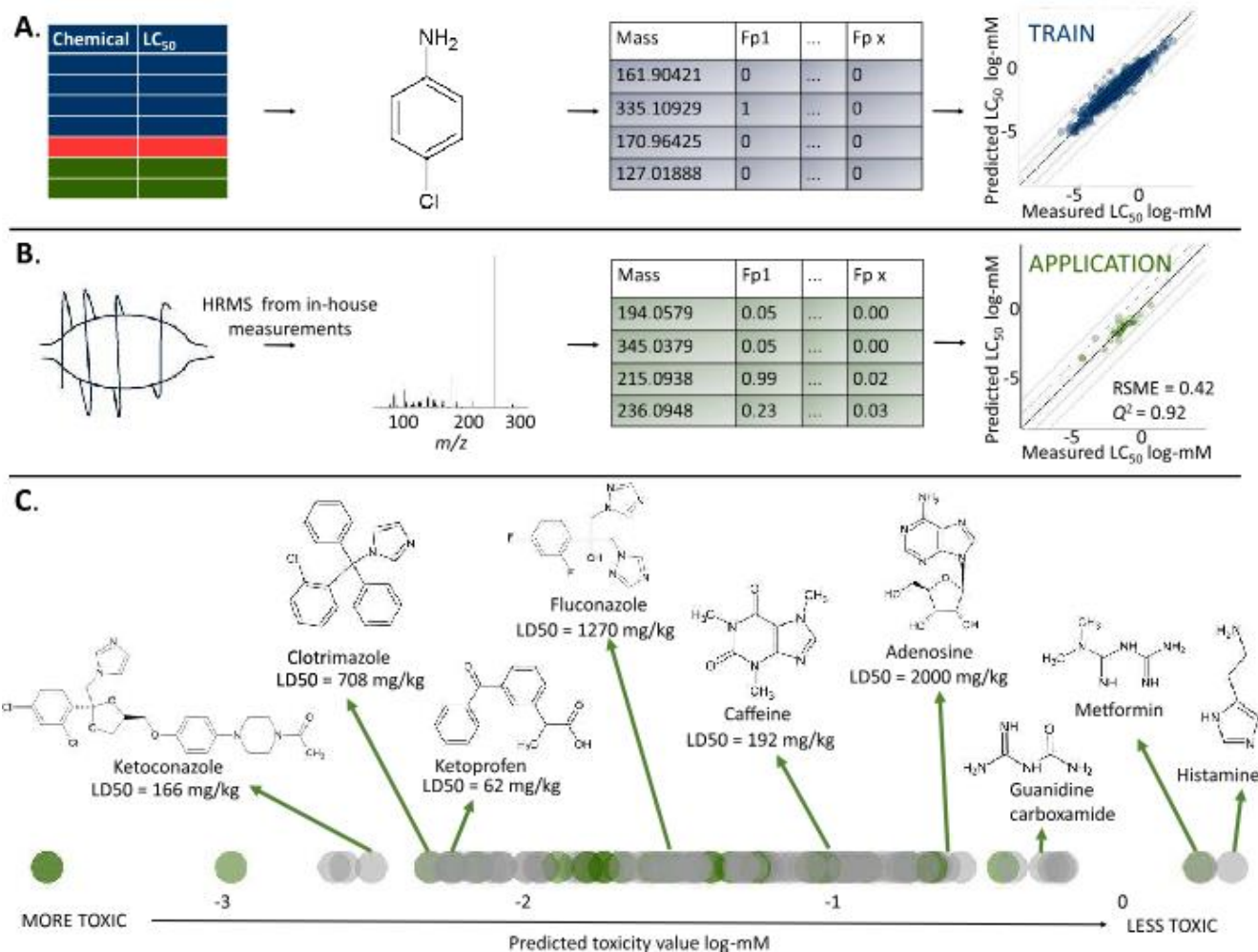
Il concetto di FEATURE e la Predictive Toxicology

La tossicologia predittiva mediante HRMS è in grado di prevedere l'impatto biologico, il metabolismo e l'ecotossicità delle sostanze chimiche — **anche anche senza conoscere l'esatta struttura molecolare di una sostanza.**

La tossicologia predittiva tradizionale si basa sulla conoscenza della struttura chimica (ad esempio, utilizzando modelli QSAR). La HRMS inserisce direttamente le feature spettrali nella sequenza di Machine Learning

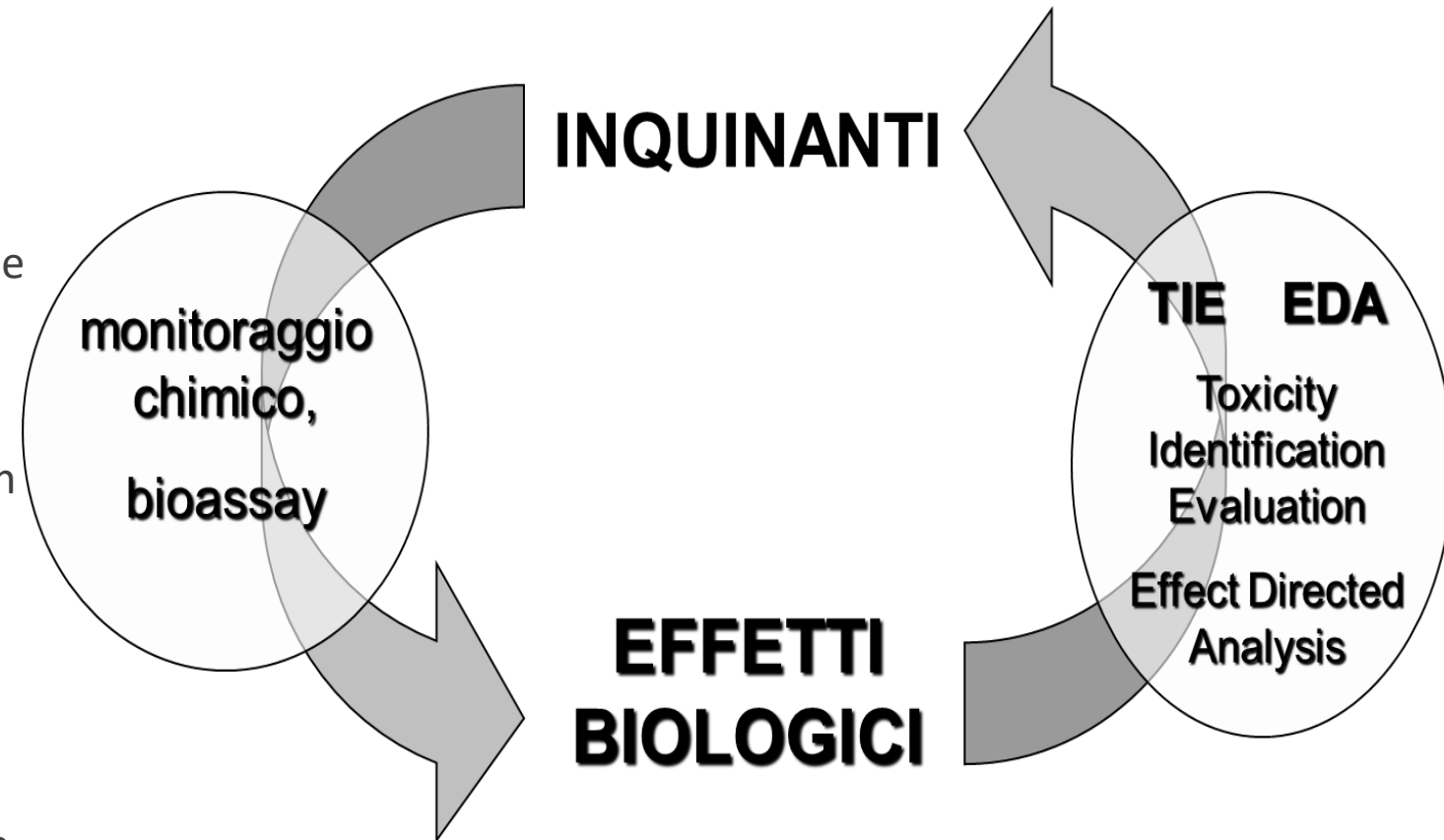
Impronta strutturale: Strumenti come **SIRIUS** e **CSI:FingerID** trasformano i *raw spectra* in *fingerprint* molecolari probabilistiche. Gli algoritmi valutano quindi questi modelli per prevedere le risposte biologiche tossiche.

Previsione diretta delle proprietà: Software avanzati come **MS2Tox** utilizzano il *machine learning* per prevedere la tossicità di sostanze non identificate sulla base delle *features* spettrali HRMS



Il monitoraggio basato su *Effect Based Methods* (EBM)

- Anche nell'ipotesi di identificare tutti gli «incogniti» presenti nell'acqua, come è possibile garantire che non vi siano rischi per la salute dell'ambiente e del consumatore?
- Sono necessari **metodi di screening biologici** che misurano **l'effetto integrato biologico/tossico della miscela**
- Sviluppando appositi ***Trigger values*** per ciascun ***Mode of Action*** o ***End point*** è possibile **classificare** la qualità di un corpo idrico
- Si possono integrare in sistemi di monitoraggio ***early warning***
- Da specifici effetti ecotossicologici si può risalire all'**identificazione dell'inquinante** che causa questi effetti

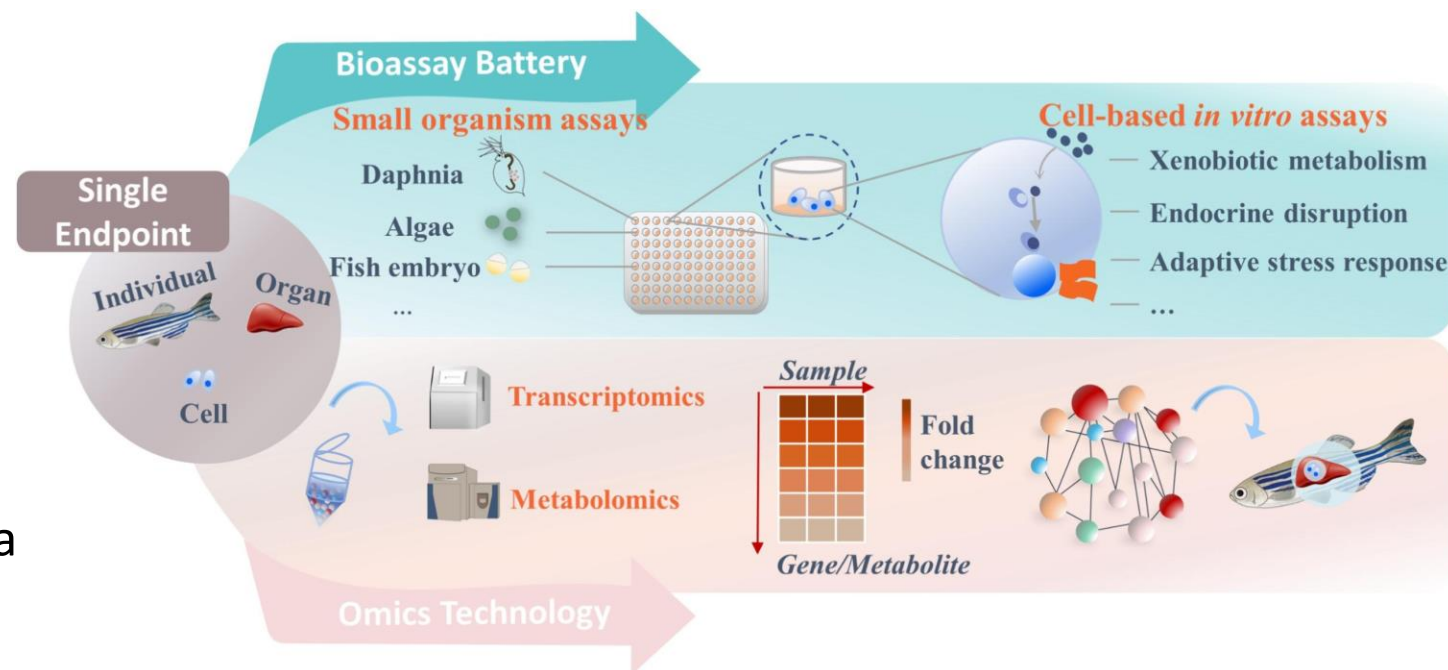


Componenti chiave degli EBM nel quadro della WFD

Test biologici in vivo: Test su organismi interi (ad es. utilizzando alghe, *Daphnia* o embrioni di pesce) che misurano la tossicità apicale acuta o cronica.

Biomarker: Misurazioni delle risposte biochimiche, fisiologiche o istologiche in organismi autoctoni o sentinella esposti al campione o in campo.

Bioassay in vitro: Analisi cellulari mirate a specifiche modalità d'azione (MoA), quali la interferenza endocrina (ad es. l'estrogenicità), lo stress ossidativo o la genotossicità.



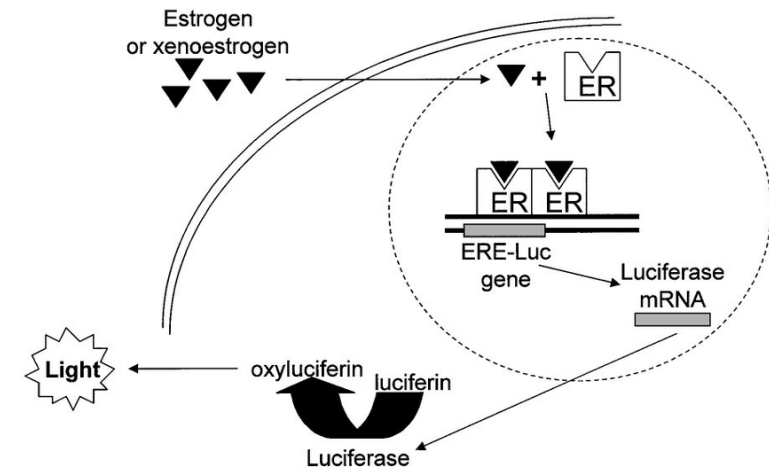
Screening con test in vitro

- Ames fluctuation assay (**mutagenicity**)
- EROD assay con cellule RTL-W1 (**dioxin-like activity**)
- AR-CALUX (**androgenicity**)
- ER-CALUX (**estrogenicity**)
 - A human cell line containing the gene for the human estrogen/androgen receptor coupled with a so-called reporter gene (gene for the enzyme luciferase) is used for this test.
- YES-test (**estrogenicity**)
 - In the Yeast Estrogen Screen, genetically modified yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*), which contain the gene for the human estrogen receptor coupled with a so-called reporter gene (LacZ), indicate estrogenic effects.
- *E-screen*: cell proliferation assay (cellule MCF-7) (**estrogenicity**)

REGOLAMENTO (UE) 2017/644 DELLA COMMISSIONE

del 5 aprile 2017

che stabilisce i metodi di campionamento e di analisi per il controllo dei livelli di diossine, PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili in alcuni prodotti alimentari e che abroga il regolamento (UE) n. 589/2014



EBM e WFD

I **metodi basati sugli effetti (EBM)** integrano il monitoraggio chimico tradizionale rilevando la tossicità combinata (da miscela) di composti noti e sconosciuti che condividono una specifica modalità d'azione

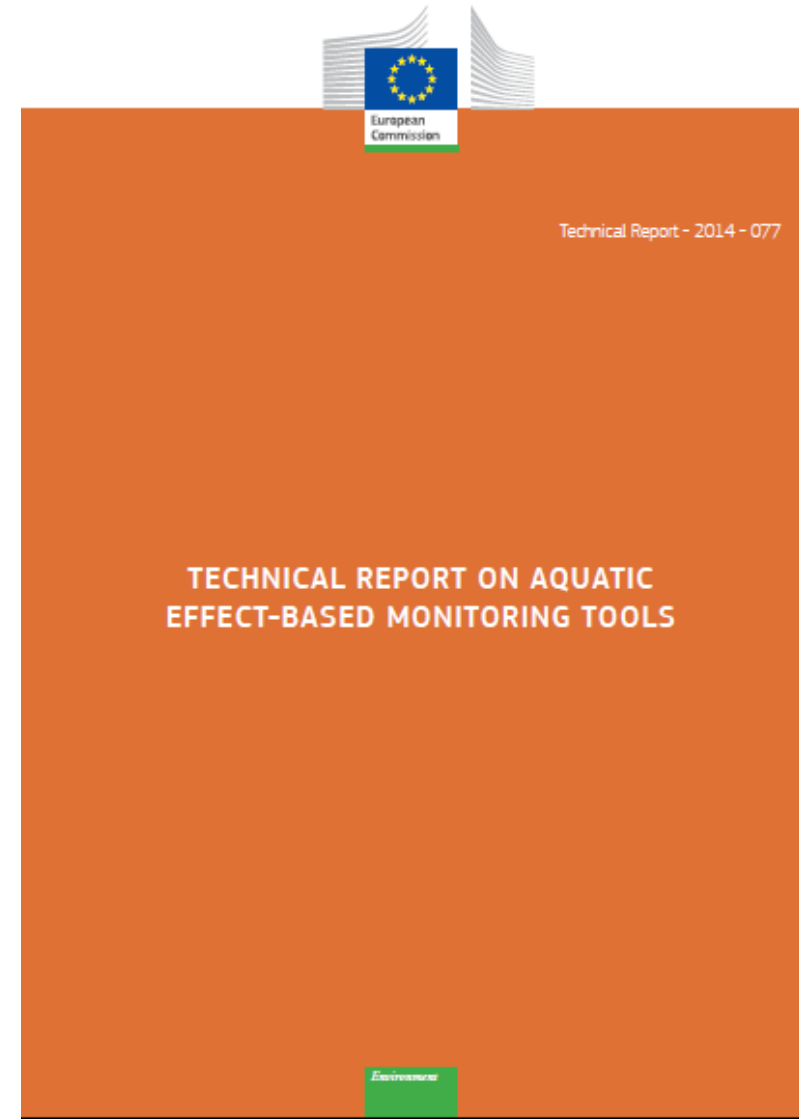
E' stato inserito nella **Direttiva (UE) 2026/805** per la valutazione degli effetti estrogenici cumulativi nelle acque superficiali.

Articolo 8 bis

Disposizioni specifiche per talune sostanze

Per un periodo di due anni a decorrere dal 1 gennaio 2030, gli Stati membri monitorano la presenza di **sostanze ad azione estrogenica** nei corpi idrici, usando **metodi di monitoraggio basati sugli effetti**.

CIS-WFD Technical Report 2014-077



Si possono usare EBM per la classificazione? I Trigger value

Un **valore Effect-Based Trigger (EBT)** è una *soglia di riferimento utilizzata nel monitoraggio delle acque tramite test biologici in vitro o in vivo per segnalare quando le miscele chimiche provocano un'attività biologica preoccupante*.

Il metodo standard e più pratico per derivare un EBT è l'**approccio «read-across»** basato su valori guida chimici esistenti (come gli Standard di Qualità Ambientale o i valori guida per l'acqua potabile).

Selezionare un composto di riferimento: Scegliere una sostanza chimica di riferimento potente e ben studiata per la specifica modalità d'azione o il test biologico (ad es. il 17 β -estradiolo per l'estrogenicità).

Raccogliere i valori guida (GV): Raccogliere i limiti di concentrazione di sicurezza normativi esistenti (EQS o concentrazioni massime ammissibili) per le singole sostanze chimiche note per innescare quel test biologico specifico.

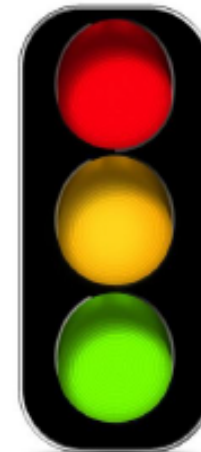
Determinare la potenza relativa (REP): Ottenere o calcolare la potenza relativa di ciascuna singola sostanza chimica rispetto al composto di riferimento, utilizzando le concentrazioni di effetto massimo al 50% (EC₅₀) misurate nello stesso test biologico.

Calcolare gli equivalenti bioanalitici : Moltiplicare il valore guida di ciascuna sostanza chimica per la sua potenza relativa per determinare la sua concentrazione bioanalitica equivalente di sicurezza

2013: CALUX based trigger values for drinking water

CALUX > trigger value → more detailed examination warranted

CALUX < trigger value → health risks can be waived



Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays



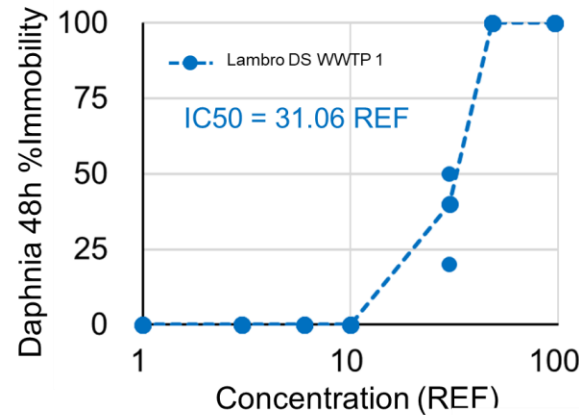
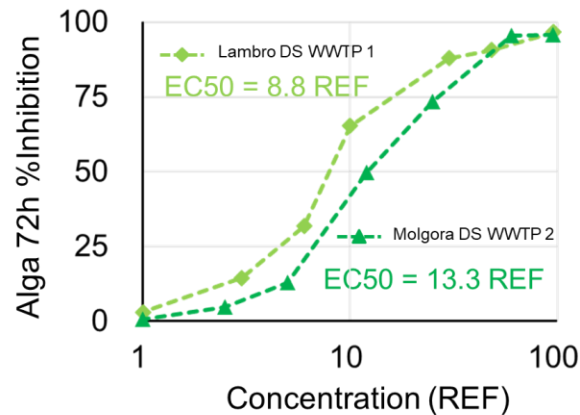
Walter Brand ^{a,*}, Cindy M. de Jongh ^{a,1}, Sander C. van der Linden ^b, Wim Mennes ^c, Leo M. Puijker ^a, Cornelis J. van Leeuwen ^a, Annemarie P. van Wezel ^a, Merijn Schriks ^{a,**}, Minne B. Heringa ^{a,2}

Bioassay	Trigger value
ERα CALUX	3.8 ng E2-eq./L
AR CALUX	11 ng DHT-eq./L
GR CALUX	21 ng Dex-eq./L
PR CALUX	333 ng Org2058-eq./L

Identificazione dei driver di tossicità: integrazione tra EBM e NTS

Ricavando **EC50 del campione** per 2 end points

Modello del **Concentration - Addition** e concetto delle **Concentrazioni Equivalenti (TEQ)** per definire il contributo dei composti analizzati agli effetti tossici della miscela



$$TEQ_{chem(i)} = \frac{EC50_{(ref)}}{EC50_{(i)}} * Conc_{(i)}$$

$$TEQ_{chem-Mixture} = \sum TEQ_{chem(i)}$$

vs.

$$TEQ_{bio} = EC50_{(ref)} / EC50_{(sample)}$$

Livelli di esposizione
vs.
Livelli di effetto

Applicando il Modello di Concentration-Addition, abbiamo evidenziato i **driver di tossicità per ciascun end point** conoscendo le concentrazioni di un numero elevato di sostanze misurate in un'analisi HRMS

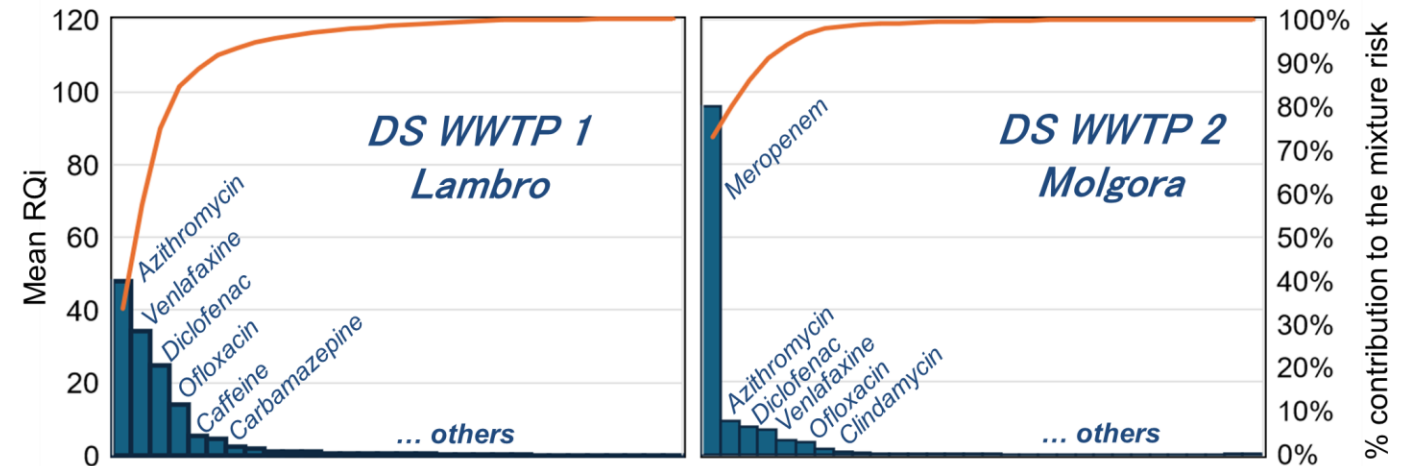
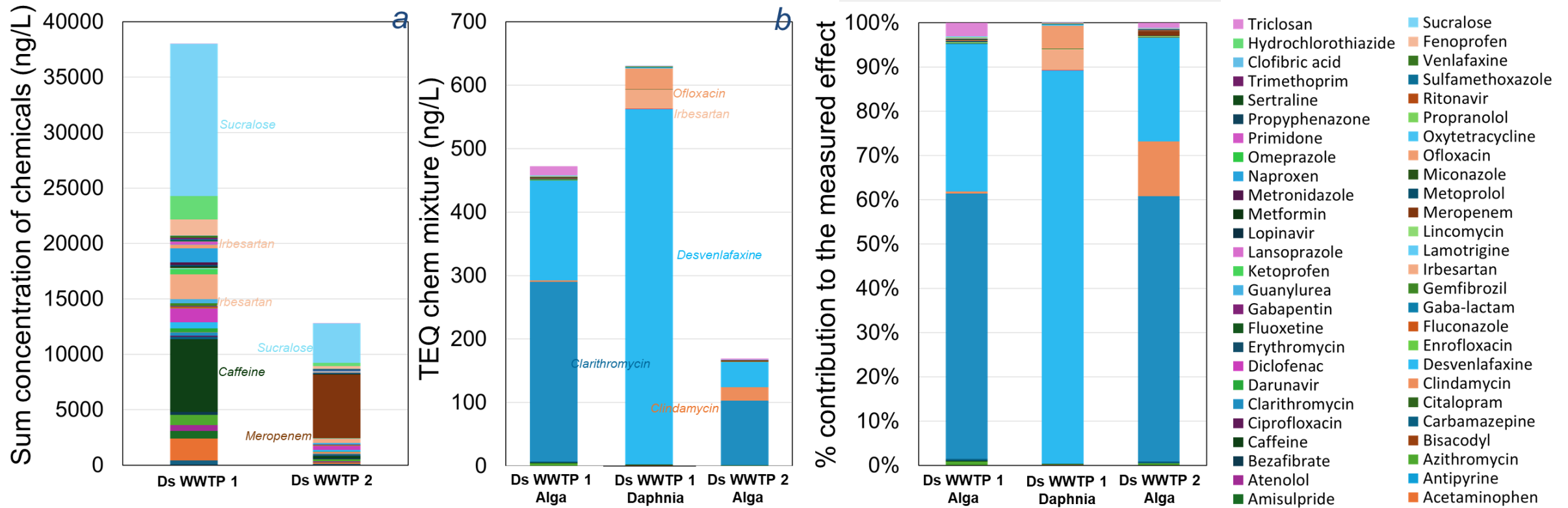


Fig. 2 - % contribution of each compound to the total risk of the two mixtures

Identificazione dei driver di tossicità: integrazione tra EBM e NTS



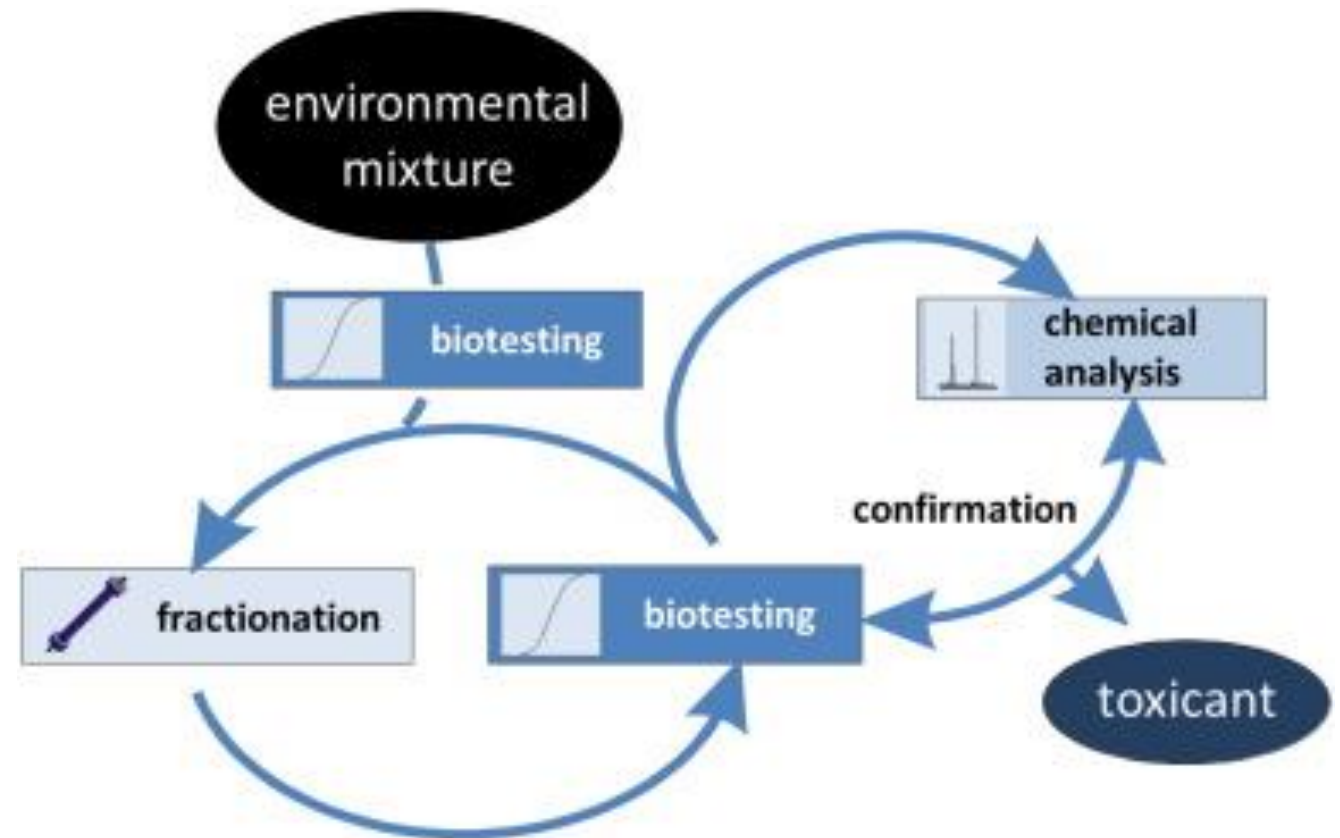
Il metodo è descritto in *Palumbo et al., Environmental Toxicology and Chemistry, 41, 2022, 404–2419*,
<https://doi.org/10.1002/etc.5424>

Effect directed analysis (EDA)

L'analisi orientata agli effetti (EDA) parte dall'effetto tossico osservato per isolare e identificare l'esatto fattore responsabile di tale tossicità.

L'EDA si basa su un processo iterativo e graduale per scomporre miscele complesse (come acqua fluviale, le acque reflue o i sedimenti) in frazioni da testare ed analizzare singolarmente. I passaggi sono:

1. Estrazione e preconcentrazione
2. Frazionamento mediante HPLC preparativo
3. Analisi di ogni singola frazione mediante bioassay
4. Identificazione chimica mediante HRMS
5. Identificazione della o delle sostanze tossiche specifiche responsabili dell'attività biologica



Conclusioni

- L'integrazione di NTS, high throughput testing platforms, Machine Learning (e AI in generale) è il futuro della prevenzione del rischio
- Legislazione è molto lenta ad aggiornarsi e i valori limite per singola sostanza o per famiglia sono ancora indispensabili come mezzo di controllo e strumento sanzionatorio
- Una via per iniziare a sfruttare queste potenzialità si trova nei modelli di valutazione del rischio come i Piani di Sicurezza dell'Acqua (PSA), o Water Safety Plan, Decreto Legislativo 18/2023 (in attuazione della direttiva UE 2020/2184) e la valutazione del rischio per il riuso delle acque Regolamento (UE) 2020/741

Grazie per l'attenzione

polesello@irsa.cnr.it



Giovanni Segantini, *Costume grigionesse*, 1888,
Museo Segantini, St. Moritz, Svizzera