



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di laurea magistrale in Scienze
Ambientali, Informatica e
Statistica
Monitoraggio e risanamento dell'ambiente

Tesi di laurea

Analisi della tecnica di *mycoremediation*
applicata alla bonifica delle Ex Cave Casarin

Relatrice

Prof.ssa Cristina Cavinato

Laureando

Samuel Boem

Matricola 882511

Anno accademico

2025/2026



Abstract

Il biorisanamento tramite funghi, meglio descritto come *mycoremediation*, è una procedura di bonifica del terreno non invasiva, di basso impatto acustico e visivo che permette la degradazione di diversi composti tossici per l'uomo.

In questa tesi verrà presentata la bonifica di terreni contaminati da Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) in un sito a nord-est della provincia di Venezia, eseguita dall'azienda Desam S.r.l. e supervisionata da Veritas S.p.a., dalla fase di caratterizzazione all'Analisi di rischio, integrando campionamenti e analisi di laboratorio con l'obiettivo di verificare l'efficacia dell'intervento a cinque mesi dall'inoculo dei microfunghi.

Sommarario

1.0 Introduzione	4
1.1 Normativa vigente e legislazione siti contaminati	5
1.2 Idrocarburi Policiclici Aromatici	10
1.3 <i>Mycoremediation</i>	19
1.4 Obiettivi	22
2.0 Materiali e metodi	23
2.1 Inquadramento storico e geografico	23
2.2 Indagini geofisiche e campionamenti	25
2.2.1 <i>Campionamenti storici Veritas</i>	26
2.2.2 <i>Campionamento indipendente</i>	28
2.3 Inoculo microfunghi	29
2.4 Enzimi intracellulari ed extracellulari	30
2.5 Trasformazioni biochimiche	36
2.6 Monitoraggio operativo	38
2.7 Analisi in laboratorio	39
2.8 Analisi di Rischio	46
3.0 Risultati e discussione	51
4.0 Conclusione	56
5.0 Ringraziamenti	57
6.0 Bibliografia e sitografia	58
Allegato 1	60
Allegato 2	61
Allegato 3	64
Allegato 4	65
Allegato 5	68

1.0 Introduzione

A seguito della seconda rivoluzione industriale, 1870 circa, l'uomo è riuscito a creare un ecosistema antropico di industrie, partendo dalle cave minerarie per l'estrazione delle materie prime, ai siti per la lavorazione e alla realizzazione di manufatti, che hanno permesso un rapido sviluppo tecnologico a scapito degli ecosistemi naturali. Infatti, data la scarsa conoscenza, o noncuranza, delle ripercussioni dei sistemi produttivi sugli habitat circostanti, al giorno d'oggi ritroviamo nella totalità del globo l'impronta antropica del passato, dall'aria all'acqua al suolo, dove quest'ultimo sarà di particolare interesse per lo sviluppo di questa tesi.

L'inquinamento del suolo riguarda diversi tipi di prodotti xenobiotici e i loro effetti sull'ambiente e salute umana sono tutt'ora in fase di studio.

Un esempio è l'utilizzo fino a trent'anni fa di fitofarmaci (pesticidi ed erbicidi) che contenevano arsenico. A seguito di piogge, i fitofarmaci venivano lisciviati dal comparto biotico e trasportati fino alla falda in cui sono soggetti a bioaccumulo e biomagnificazione nella rete trofica, con probabile ingestione da parte dell'uomo e conseguente sviluppo di forme tumorali anche attraverso un'esposizione ad una concentrazione minima.

In questo lavoro di tesi, la presenza di Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), anch'essi cancerogeni e genotossici per l'uomo, sarà trattata più nello specifico con l'intento di evidenziare le problematiche relative alla diffusione di questi inquinanti e le possibili vie di degrado, biotiche nello specifico, necessarie per trasformare ed eventualmente eliminare i sottoprodotti. Nel rapporto ITISAN 03/22 viene presentata un'ubiquità di IPA fino ad interessare la nostra dieta giornaliera: *“Gli IPA sono presenti, in quantità ampiamente variabili, pressoché in tutti gli alimenti. Tale presenza può essere dovuta a contaminazione ambientale, principalmente per deposizione di materiale particolato atmosferico e per assorbimento da matrici contaminate, quali suolo e acque fluviali o marine, oppure a formazione durante determinati processi di lavorazione, soprattutto l'essiccazione attraverso fumi di combustione e l'affumicatura con metodi tradizionali”*.

1.1 Normativa vigente e legislazione siti contaminati

Al giorno d'oggi le norme in materia ambientale sono descritte dal D. Lgs. 152/2006 (Testo unico ambientale), parte IV, titolo V “Bonifica Siti Contaminati”, aggiornato dal D. Lgs. 4/2008 che definisce le procedure di Valutazione Impatto Ambientale (VIA) e la Valutazione Ambientale Strategica (VAS).

All'interno del titolo V ritroviamo quindici articoli, dall'Art. 239 all'Art. 253 e cinque allegati. Nell'Art. 239 vengono definiti i soggetti che devono disciplinare le aree contaminate: *“Gli interventi di bonifica e ripristino ambientale per le aree caratterizzate da inquinamento diffuso sono disciplinati dalle regioni con appositi piani, fatte salve le competenze e le procedure previste per i siti oggetto di bonifica di interesse nazionale e comunque nel rispetto dei criteri generali di cui al presente titolo”*.

Nell'Art. 240 invece vengono definiti due parametri fondamentali per la bonifica ambientale:

- **Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC)**
Individua il valore minimo di una sostanza per la quale è necessario eseguire una caratterizzazione del sito d'interesse e l'Analisi di Rischio sito specifica. I valori a cui fare riferimento sono espressi nell'Allegato V e vengono suddivisi in due categorie differenti a seconda della destinazione d'uso del terreno: se verde pubblico sia privato che residenziale oppure a scopo commerciale e industriale.
- **Concentrazione Soglia di Rischio (CSR)**
Individua le concentrazioni ottenute a seguito dell'AdR, il cui superamento necessita la messa in sicurezza del sito e la successiva bonifica.

Da questi due parametri possiamo identificare un sito contaminato nel quale le CSR di uno o più contaminanti vengono superate, da un sito non contaminato per il quale le CSC non risultano superate oppure sono superate ma comunque sono al di sotto delle CSR.

Per quanto riguarda le messe in sicurezza, ovvero le procedure da attuare a seguito del superamento delle CSR, l'Art. 240 ne definisce tre tipologie principali:

- Messa in sicurezza d'emergenza

Avviene a seguito di una contaminazione elevata che può portare a rischi imminenti per la popolazione e per l'ambiente, sono interventi immediati che cercano di limitare la diffusione degli inquinanti e impedire il contatto con altre matrici ambientali e può avvenire anche senza l'Adr.

- Messa in sicurezza operativa

È un insieme di interventi, tra cui il contenimento della fonte di contaminazione e sistemi di monitoraggio, che vengono eseguiti in un sito contaminato in cui è presente un'attività in esercizio. Deve essere garantito un livello di sicurezza minimo per le persone presenti e per l'ambiente circostante.

- Messa in sicurezza permanente

È l'intervento che richiede un isolamento completo della fonte di contaminazione dalle matrici ambientali circostanti. Sono previsti dei piani di monitoraggio a lungo termine e delle limitazioni d'uso per il sito.

Nell'Art. 242 è identificato il responsabile dell'attivazione del procedimento della bonifica, ci si basa sul principio di "*chi inquina paga*". Se invece la contaminazione è rilevata in un'area in cui non si è potuto riscontrare il responsabile, l'Art. 245 designa il proprietario o gestore di quell'area ad attivare il procedimento di bonifica e successivamente sarà la pubblica Amministrazione a identificare il soggetto colpevole.

L'Art. 251 si occupa dell'anagrafe dei siti da bonificare per ogni regione basandosi sui criteri definiti dall'Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale (ISPRA). Quest'elenco deve contenere: i siti su cui sono stati realizzati interventi di bonifica, l'identificazione dei soggetti responsabili e un elenco di enti pubblici che possono intervenire in caso di inadempienza dei responsabili.

La Legge n. 426/1998 "*Nuovi interventi in campo ambientale*" evidenzia alcune aree industriali ad alto rischio ambientale, aree per le quali lo Stato si è impegnato a portare avanti interventi di messa in sicurezza e bonifica (ARPAV).

Al giorno d'oggi, i siti contaminati in Italia sono 59, come possiamo vedere dalla fig.1.1, dati aggiornati al 30 giugno 2025 (ISPRA). La definizione dei confini dei siti può variare nel tempo, aumentando o riducendo le superfici interessate, ciò avviene sulla base di nuove informazioni sulla contaminazione presente nel sito.

Nel nostro caso ci riferiamo al SIN (Siti di interesse nazionale) di Porto Marghera, nel quale a partire dagli anni '30 è stato il punto di riferimento per la produzione bellica di navi nell'Alto Adriatico con 51 stabilimenti attivi nei settori metallurgici, meccanici, cantieristici.

Successivamente convertito in un polo industriale, nel secondo dopoguerra, per la produzione di plastica, acciaio e diversi composti chimici.

Venne realizzato un grande impianto per la produzione di ammoniaca sintetica da utilizzare come concime azotato dalla società americana Monsanto, e agli inizi degli anni '50 vennero creati i primi reparti per la produzione di cloruro di vinile che stanno alla base della filiera della plastica.

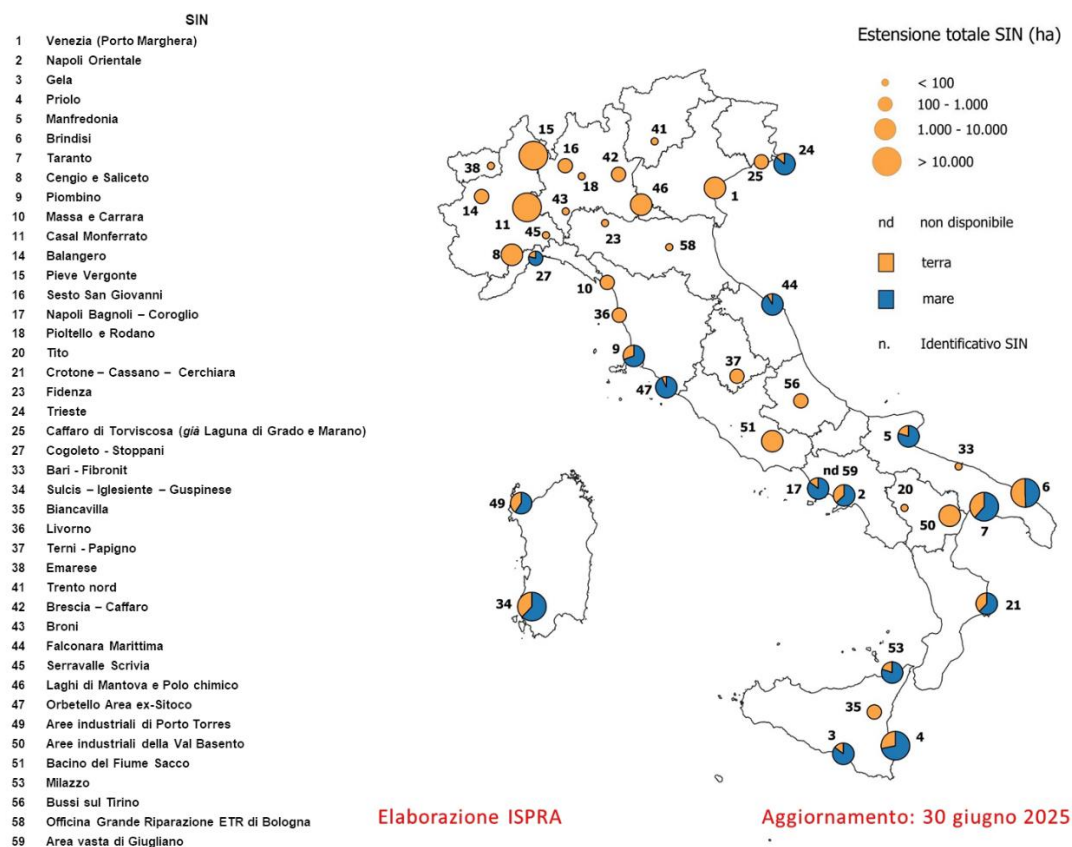


Figura 1.1: Ubicazione dei SIN nella penisola italiana

Nel 1965 si registrò il numero massimo di lavoratori al petrolchimico: 32.980 tra operai e addetti; l'anno dopo si creò l'azienda Montedison (fusione tra Edison e Montecatini) con un controllo pari all' 84% del polo industriale.

Prima degli anni '70 non esisteva alcuna misura di prevenzione e tutela né per gli operai, che manifestavano l'insorgenza di tumori e malattie respiratorie e/o cardiovascolari, né per la laguna circostante che riceveva costantemente gli scarti di lavorazione delle varie industrie.

Con il D.M. 23 febbraio 2000, è stata individuata la perimetrazione del SIN ai sensi dell'articolo 1, comma 4, della legge 426/98 dove si identificava un territorio di 3.221 ettari di aree terrene e 2.200 ettari di aree lagunari ma successivamente modificato dal D.M. n. 144 del 24 aprile 2013 in cui si sono ridefiniti i confini del SIN che prevedono esclusivamente 1.618 ettari di aree terrene, come possiamo vedere dalla fig.1.2.

Le problematiche ambientali del sito sono rappresentate dalla presenza, nella zona insatura, ovvero nel suolo, di metalli e Idrocarburi Policiclici Aromatici, mentre nella zona satura, ovvero nella falda, di entrambi i contaminanti riscontrati in superficie con la presenza di composti organo-clorurati.

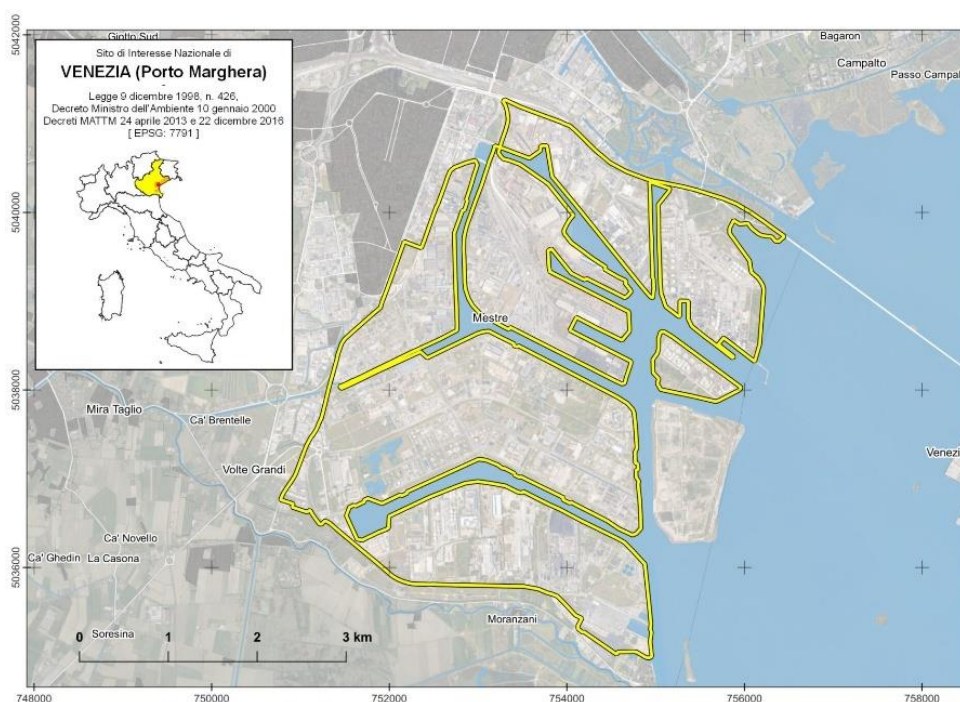


Figura 1.2: Perimetro SIN Porto Marghera

L'intervento di bonifica che verrà affrontato nei prossimi paragrafi è stato finanziato da fondi del Piano Nazionale Ripresa e Resilienza (PNRR) nell'ambito delle azioni disposte dalla Misura M2C4 attuata dal Decreto Ministeriale n. 173 del 07/05/2024, che modifica il DM n. 301 04/08/2022 "Piano d'azione per la riqualificazione dei siti orfani in attuazione della misura Missione 2, Componente 4, Investimento 3.4" assegnando alla regione Veneto un finanziamento pari a euro 31.363.466,01 (Bollettino Ufficiale Regione Veneto) i cui dati sono riportati nell'Allegato 1.

Fondamentale è la definizione di "sito orfano" per il quale si intende un sito potenzialmente contaminato in cui non è stato avviato o si è concluso il procedimento di bonifica in cui il responsabile dell'inquinamento non è individuabile o non provvede agli adempimenti previsti dal titolo V, parte quarta del D. Lgs. 152/06 o a quelli previsti dal decreto ministeriale 1° marzo 2019 n. 46, oppure un sito rispetto al quale i soggetti di cui agli articoli 242 e 245 non concludono le attività e gli interventi previsti.

Invece sono espressamente esclusi dai finanziamenti previsti per i siti orfani, ai sensi dell'art. 3 DM del 29 dicembre 2020:

- gli interventi in corso di esecuzione o per i quali sono già individuate e destinati altri fondi di finanziamento;
- attività di rimozione dei rifiuti, salvo il caso in cui i rifiuti costituiscano fonti di contaminazione delle matrici ambientali circostanti;
- interventi relativi alle strutture edilizie e impiantistiche, ad eccezione degli interventi necessari per consentire la bonifica delle matrici ambientali;
- di bonifica disciplinati da leggi speciali, se non nei limiti di quanto espressamente richiamato dalle medesime o di quanto dalle stesse non disciplinato;
- interventi di bonifica e ripristino ambientale delle aree caratterizzate da inquinamento diffuso.

1.2 Idrocarburi Policiclici Aromatici

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono una classe di inquinanti cancerogeni e genotossici che possono derivare dalla parziale e/o incompleta combustione dei prodotti petroliferi o da fenomeni naturali come eruzioni vulcaniche o incendi boschivi. Hanno come caratteristica principale quella di avere uno o più anelli aromatici legati tra di loro, rendendoli particolarmente resistenti alla degradazione sia biotica che abiotica.

Nella tab. 1.1 sono riportati i valori di CSC relativi agli IPA nel suolo. Attenzione: non vale per la contaminazione nella falda per la quale avremo altre concentrazioni presenti in Tab. 1.2.

Tabella 1.1: CSC di IPA nel suolo per le varie destinazioni d'uso

Composto IPA	Colonna A	Colonna B
	CSC uso Residenziale / verde (mg/kg)	CSC uso Commerciale / industriale (mg/kg)
Benzo[a]antracene	0,5	10
Benzo[a]pirene	0,1	10
Benzo[b]fluorantene	0,5	10
Benzo[k]fluorantene	0,5	10
Benzo[g,h,i]perilene	0,1	10
Crisene	5	50
Dibenzo[a,e]pirene	0,1	10
Dibenzo[a,l]pirene	0,1	10
Dibenzo[a,i]pirene	0,1	10
Dibenzo[a,h]pirene	0,1	10
Dibenzo[a,h]antracene	0,1	10
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	0,1	5
Pirene	5	50
Sommatoria IPA	10	100

Tabella 1.2: CSC di IPA per i valori presenti in falda

Composto IPA	CSC in falda (µg/L)
Benzo[a]antracene	0,1
Benzo[a]pirene	0,01
Benzo[b]fluorantene	0,1
Benzo[k]fluorantene	0,05
Benzo[g,h,i]perilene	0,01
Crisene	5
Dibenzo[a,h]antracene	0,01
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	0,1
Pirene	50
Sommatoria IPA	0,1

Questi idrocarburi sono molto resistenti alle reazioni di ossidazione e riduzione, fattore fondamentale che vedremo successivamente per la *mycoremediation*. Si conoscono molteplici tipi di IPA (nelle pagine successive verranno descritti parzialmente quelli oggetto di bonifica) i quali vengono suddivisi in tre tipologie in base al loro peso atomico (Ferreira *et al.*, 2025):

- *Lower Molecular Weight-PAHs* composti con due o tre anelli aromatici;
- *Intermediate Molecular Weight-PAHs* composti con quattro anelli aromatici;
- *High Molecular Weight-PAHs* composti formati da cinque o più anelli aromatici.

Un carattere fisico-chimico importante riguarda proprio la struttura, infatti, man mano che il loro peso molecolare aumenta anche la loro lipofilità (Feng *et al.*, 2024) ma ne diminuisce conseguentemente la loro volatilità.

I *LMW-PAHs* sono emessi principalmente sotto forma gassosa e possono disciogliersi facilmente nella fase acquosa, gli *IMW-PAHs* possono distribuirsi sia nella fase gassosa che in quella particolata in funzione della temperatura (Ferreira *et al.*, 2025), invece, gli *HMW-PAHs* sono generalmente emessi sotto forma particolata e/o associati a particolato il che li renderà particolarmente predisposti all'accumulo nei sedimenti.

Come già anticipato, l'esposizione agli IPA può avvenire sia per inalazione, come per esempio tramite fumi esausti provenienti dalle marmitte catalitiche delle auto, sia per

ingestione, poiché, questi composti entrano facilmente nella catena trofica e persistono nei tessuti vegetali e animali. Un'altra via d'esposizione può essere il contatto dermico, particolarmente rilevante nell'industria dell'asfalto e produzione di benzine.

Il meccanismo di formazione di questi composti può essere ricondotto al cosiddetto “cracking” ovvero rottura dei polimeri presenti all'intero dei normali combustibili o della biomassa lignea, per poi condensare in forme più semplici che vedremo nel paragrafo 2.2. Esistono diverse modalità con cui i nostri IPA si possono formare e sono tutt'ora oggetto di studio, ma quelli più studiati sono tre: l'*Hydrogen-Abstraction C₂H₂ Addition* (HACA), l'*Hydrogen-Abstraction/Vinyl radical Addition* (HAVA) e la *Cycloaddition/Fragmentation route* (CAF) (Mohammednoor and Labeeb, 2024). I primi due meccanismi interessano gli IPA a basso/medio peso molecolare come fenantrene e naftene, mentre il terzo spiega la formazione per i composti a medio/alto PM come il benzo[a]antracene.

La tossicità di questi composti deriva dalla capacità di questi inquinanti di entrare facilmente dentro alla cellula e subire trasformazioni chimiche ad opera dei complessi enzimatici del citocromo P-450 (monoossigenasi e perossigenasi), i quali hanno lo scopo di “aggiungere” atomi di ossigeno rendendo i composti xenobiotici meno lipofili e maggiormente polari. Quando raggiungono il nucleo cellulare, formano legami covalenti con il DNA (Ewa and Danuta, 2017) portando a modificazioni chimiche della struttura a doppia elica. Come risultato all'esposizione agli IPA abbiamo stress ossidativo correlato direttamente con le mutazioni geniche e insorgenza di cancro (Ewa and Danuta, 2017).

La cancerogenicità di questi composti si basa sul criterio di classificazione degli agenti cancerogeni sviluppato dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) in continuo aggiornamento e dal “*Guideline for Carcinogen Risk Assessment*” sviluppato dall'*Environmental Protection Agency* (EPA).

Tutti i parametri chimico-fisici degli IPA presentati nelle pagine seguenti sono stati presi dal sito PubChem.gov.

Naftalene (C₁₀H₈)

Il naftalene è l'idrocarburo policiclico aromatico, o meglio biciclico, più leggero di tutti (LMW), fig. 1.3, è utilizzato in industria principalmente come solvente con un peso molecolare di 128,17 g/mol, un punto di fusione di 80,2 °C e una solubilità di 31 ml/L a 25°C. Viene classificato come cancerogeno classe 2B come “possibile cancerogeno per l'uomo” poiché i dati sull'esposizione umana non sono affidabili.

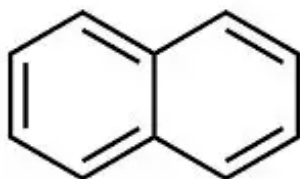


Figura 1.3: Struttura chimica del naftalene

Acenaftene (C₁₂H₁₀) e Acenaftilene (C₁₂H₈)

L'acenaftene, insieme all'acenaftilene, sono composti triciclici aromatici che possiamo osservare, rispettivamente nelle fig. 1.4. Il primo composto presenta due anelli aromatici con l'aggiunta di un anello di forma pentagonale non aromatico, ha un peso molecolare di 154,21 g/mol, un punto di fusione di 93 °C, una solubilità in acqua di 3.9 ml/L a 25 °C. Non è riconosciuto come cancerogeno ma comunque può causare irritazione agli occhi se si venisse a contatto.

L'acenaftilene presenta due anelli aromatici esagonali e un anello aromatico di forma pentagonale, ha un peso molecolare di 152,19 g/mol, un punto di fusione di 89,4 °C, una solubilità in acqua di 3.93 mg/L a 25 °C. Anch'esso non è classificato come cancerogeno dall'IARC ma comunque può portare a irritazione agli occhi e alla cute.

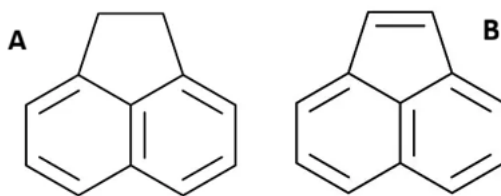


Figura 1.4: Struttura chimica dell'acenaftene (A) e acenaftilene (B)

Fluorene ($C_{13}H_{10}$)

Il fluorene è un composto triciclico aromatico che presenta due anelli benzenici separati da un anello pentagonale non aromatico, come possiamo vedere dalla fig. 1.5. Presenta un peso molecolare di 166.22 g/mol, un punto di fusione di 114,76 °C, una solubilità in acqua di 1,69 mg/L a 25 °C. Non è riconosciuto come cancerogeno ma è ritenuto tossico sia in forma acuta che cronica per le forme acquatiche.

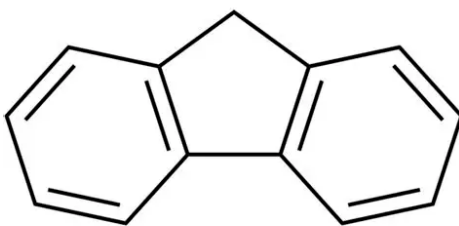


Figura 1.5: Struttura chimica del fluorene

Fluorantrene ($C_{16}H_{10}$)

Il fluorantrene è un composto simile al fluorene ma presenta un anello benzenico in più, fig. 1.6. Ha un peso molecolare di 202,25 g/mol, un punto di fusione di 110,2 °C, una solubilità in acqua pressoché nulla. È classificato dall'IARC come cancerogeno di tipo 3 ovvero “non cancerogeno per gli umani ma possibile cancerogeno per altre forme di vita”.

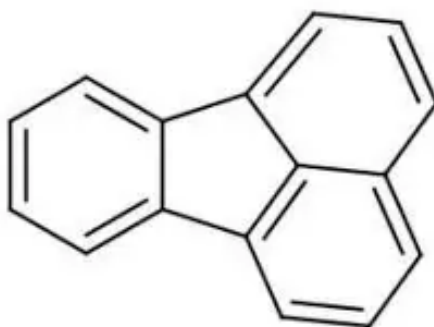


Figura 1.6: Struttura chimica del fluorantrene

Antracene e fenantrene (C₁₄H₁₀)

L'antracene e il fenantrene sono composti triciclici aromatici che presentano tre anelli aromatici legati in maniera diversa tra di loro. Entrambi i composti presentano un peso molecolare di 178,23 g/mol ma hanno punti di fusione diversi, infatti, quello dell'antracene è di 216 °C invece quello del fenantrene è di 99 °C. Anche la solubilità è diversa, l'antracene presenta un valore di $4,34 \times 10^{-2}$ mg/L e il fenantrene invece un valore di 1,15 mg/L a 25 °C.

La struttura chimica del fenantrene è interessante perché crea due siti che avranno una denominazione particolare che vale anche per i composti precedenti e successivi, la “*Bay-Region*” e la “*K-Region*” che saranno di particolare interesse per l'ossidazione di questi composti, fig. 1.7.

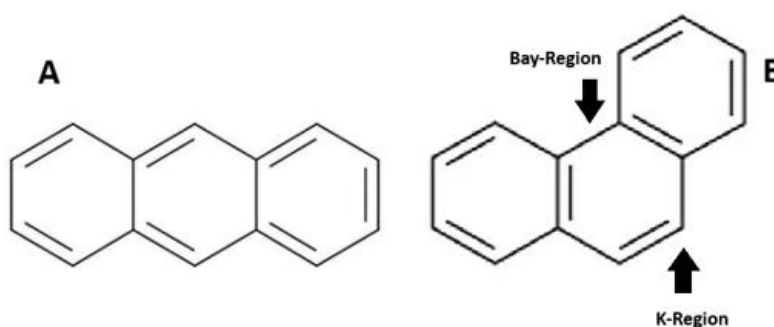


Figura 1.7: Struttura antracene (A) e siti attivi del fenantrene (B)

Pirene (C₁₆H₁₀)

Il pirene è un composto aromatico che presenta quattro anelli aromatici, fig. 1.8, un peso molecolare di 202,5 g/mol, un punto di fusione di 151,2 °C, una solubilità in acqua a 25 °C di 0,135 mg/l. L'esposizione a questo composto può provocare irritazione alla pelle, agli occhi e alle vie respiratorie e inoltre è riconosciuto come cancerogeno

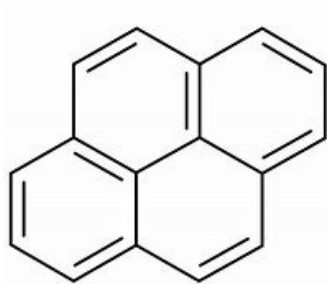


Figura 1.8: Struttura chimica del pirene

Benzo[a]antracene (C₁₈H₁₂)

È un idrocarburo policiclico aromatico composto da quattro anelli benzenici, fig. 1.9, con un peso molecolare di 228.3 g/mol, un punto di fusione di 156°C circa, una solubilità di $9,4 \times 10^{-3}$ mg/L a 25 °C. Anche questo composto è classificato dalla IARC come cancerogeno di tipo 2B.

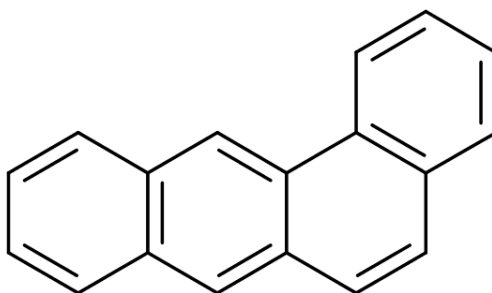


Figura 1.9: Struttura chimica benzo[a]antracene

Benzo[a]pirene (C₂₀H₁₂)

Il benzo[a]pirene, denominato anche 3,4-benzopirene, è un IPA che presenta cinque anelli benzenici legati tra di loro, fig. 1.10, possiede un peso molecolare 252,3 g/mol, un punto di fusione di 179 °C, una solubilità di $1,62 \times 10^{-3}$ mg/L a 25 °C. Riconosciuto come mutageno e cancerogeno di categoria 1B.

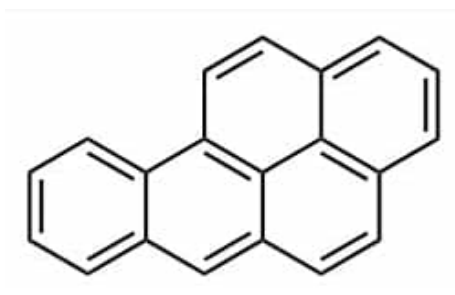


Figura 1.10: Struttura chimica del benzo[a]pirene

Benzo[b]fluorantene ($C_{20}H_{12}$)

Il benzo[b]fluorantene, denominato anche 3,4-benzofluorantene, fig. 1.11, è un IPA che presenta tre anelli benzenici uniti tra di loro con la presenza di due legami covalenti che legano un quarto anello benzenico. Possiede un peso molecolare di 242,3 g/mol, un punto di fusione di 168,4 °C e una solubilità in acqua pari a $1,5 \times 10^{-3}$ mg/L a 25 °C. Anch'esso è riconosciuto cancerogeno di tipo 1B.

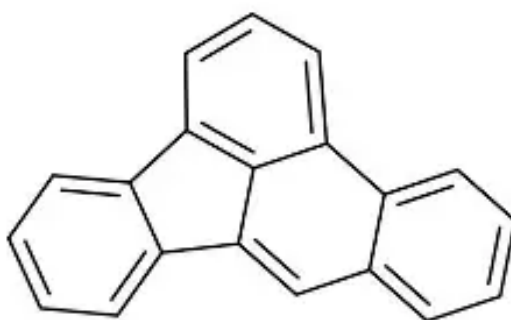


Figura 1.11: Struttura chimica del benzo[b]fluorantrene

Benzo[g,h,i]perilene ($C_{22}H_{12}$)

Il benzo[g,h,i]perilene, denominato anche 1,12-benzoperilene, fig 1.12, è un IPA che presenta cinque anelli aromatici legati tra di loro con un legame covalente tra il primo e l'ultimo anello. Possiede un peso molecolare di 276,3 g/mol, un punto di fusione di 278,3 °C, una solubilità in acqua di $2,6 \times 10^{-4}$ mg/L a 25 °C.

Questo composto non è stato classificato come cancerogeno per l'uomo ma molte evidenze scientifiche ne riportano una cancerogenicità evidente (Cheng & Yang *et al.*, 2025).

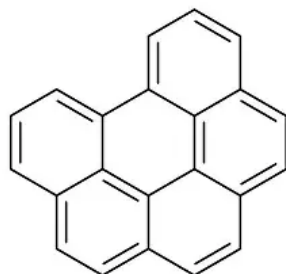


Figura 1.12: Struttura chimica del benzo[g,h,i]perilene

Indeno[1,2,3-c,d]pirene (C₂₂H₁₂)

L' indeno[1,2,3-c,d]pirene, o denominato anche 1,10-(o-fenilene)pirene, fig. 1.13, è un IPA che presenta una struttura molecolare quasi identica al benzo[b]fluorantene ma con un anello benzenico in più e peso molecolare di 276,3 g/mol (uguale al benzo[g,h,i]perilene), presenta un punto di fusione di 164 °C, una solubilità in acqua di $1,9 \times 10^{-4}$ a 25 °C. È considerato come sospetto cancerogeno.

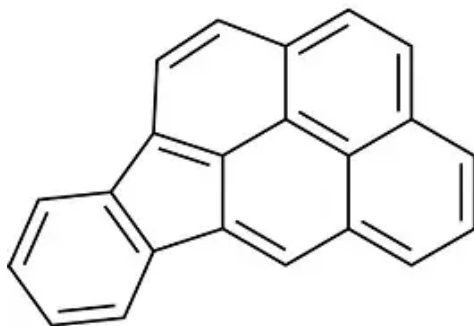


Figura 1.13: Struttura chimica dell'indeno[1,2,3-cd]pirene

Nei paragrafi precedenti sono stati presentati i principali IPA oggetto di studio in questa tesi. Non sono stati presentati il restante dei composti IPA (dibenzo[a,e]pirene, dibenzo[a,l]pirene, dibenzo[a,i]pirene, dibenzo[a,h]pirene, dibenzo[a,e]antracene, benzo[b]fluorantrene, benzo[k]fluorantrene) poiché presentano una struttura molecolare

identica a quelli già presentati ma con l'aggiunta, in diverse zone identificate dalle lettere a, e, l, b, h, g e i di un anello benzenico.

1.3 *Mycoremediation*

I funghi, in generale, sono tra gli esseri viventi più versatili in termini di struttura, metabolismo ed ecologia. Sono organismi eucarioti che riescono a colonizzare ogni tipo di habitat, le loro dimensioni possono coprire intere foreste (Akhtar and Mannan, 2020) e alcune specie possono durare per più di 5000 anni.

Comunemente conosciuti in ambito culinario e psico-terapeutico, negli ultimi anni si è cominciato a studiare la loro applicazione per le tecniche bioingegneristiche, ad esempio, per la degradazione di composti come polietilene, cemento e vernici.

La *mycoremediation* è una tecnica di biorisanamento che utilizza i microfunghi per bonificare aree terrene e acquatiche le quali presentano contaminazioni di diverse tipologie: erbicidi, pesticidi, IPA, antibiotici, metalli pesanti e ftalati (Akhtar and Mannan, 2020).

Questa tesi verte sulla valutazione della degradazione degli IPA da parte dei microfunghi, analizzando il decremento quantitativo degli inquinanti nel tempo.

L'azione di degradazione degli IPA da parte dei microfunghi deriva dalla capacità di quest'ultimi di produrre enzimi, intracellulari ed extra-cellulari, che possono ossidare gli anelli aromatici presenti, rompendo i forti legami che caratterizzano queste molecole, producendo delle molecole più piccole che potranno essere nuovamente ossidate e attaccate sempre dai basidiomiceti o da altri microorganismi presenti. Attraverso questo processo gli idrocarburi possono trasformarsi in composti non tossici o comunque a bassa tossicità come acqua e biossido di carbonio (Rani & Muthukumar *et al.*, 2024).

Inoltre, il bioassorbimento da parte dei macro-funghi riguardante principalmente i metalli presenti nel suolo è un argomento molto studiato, non applicato in questo contesto di bonifica ma importante da tenere in considerazione. Brevemente, le modalità di assorbimento possono essere di diversi tipi: sia dipendenti che non dipendenti dal metabolismo delle cellule (quest'ultimo è un processo piuttosto veloce, reversibile e non implica consumo di energia per legare il metallo alla biomassa), scambio ionico,

adsorbimento fisico e assorbimento chimico (Yadav *et al.*, 2021). Il meccanismo di bioaccumulo all'interno delle cellule disponibili avviene attraverso tre tipi di trasporto: attivo, passivo e diffusione facilitata.

La maggioranza dei funghi sono composti da strutture vegetative tubolari settate, costituite da chitina chiamate "ife", queste si propagano con una morfologia ramificata in direzioni opposte al punto di germinazione, formando il "micelio" (Rani and Muthukumar *et al.*, 2024). All'interno di queste strutture sono presenti i componenti fondamentali della cellula eucariote quali: RER (reticolo endoplasmatico ruvido), nucleo, mitocondri, citoplasma e i ribosomi deputati alla produzione di enzimi necessari allo sviluppo e difesa dell'organismo che vedremo nei seguenti paragrafi.

Ogni ifa è prodotta da una singola spora, la quale può formarsi tramite meiosi o mitosi, a seconda delle condizioni ambientali più o meno favorevoli, nel corpo fruttifero dell'organismo durante il processo di sporulazione necessario alla propagazione del fungo.

L'analisi della morfologia fungina è determinata tramite la misurazione della lunghezza delle ife e la frequenza di ramificazione, questa può essere eseguita tramite *Autoradiography* (Pitt and Bull, 1982) e *Image analysis* (Cox *et al.*, 1998). Possiamo distinguere due tipi di distribuzione spaziale delle ife: agglomerate in forme sferiche chiamate "*pellets*" oppure disperse nella matrice che prenderà il nome di "*clumps*", in fig. 1.14 troviamo un esempio di quanto detto finora.

La differenza sostanziale tra i macrofunghi e i microfunghi risiede nella dimensione del corpo fruttifero: nei primi la dimensione dell'organo riproduttivo è visibile a occhio nudo mentre nei secondi è di dimensioni microscopiche.

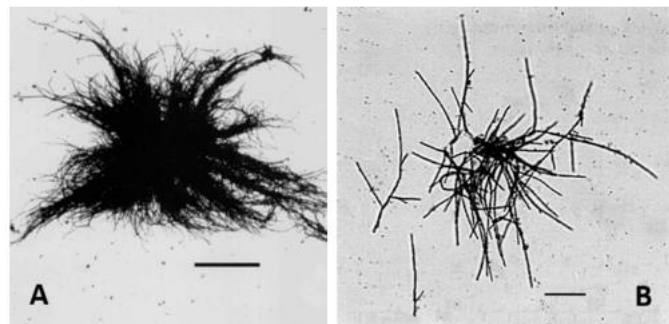


Figura 1.14: Morfologie fungine pellets (A) e clumps (B) (Cox et al., 1998)

I *path-way* che gli IPA possono subire quando vengono degradati dai funghi presenti sono molteplici, non ancora ben compresi e sono tutt'oggi oggetto di dibattito. Però da numerosi studi (Rani et al., 2024; Ferreira et al., 2025; Ayodeji et al., 2017) si è potuto distinguere dei meccanismi di degradazione degli IPA che coinvolgono principalmente delle famiglie di enzimi che possono essere sia extracellulari che intracellulari che verranno descritti nel paragrafo 2.4.

Gli enzimi intracellulari che vengono prodotti dai basidiomiceti, principalmente a livello del citosol per la detossificazione e successivo smaltimento dell'organismo dagli idrocarburi, possono suddividersi in due gruppi: Citocromo-P450 mono-ossigenasi (metabolismo fase I) e Glutathione (metabolismo fase II) (Rani et al., 2024).

Queste famiglie di enzimi hanno la capacità di metabolizzare una vasta scala di sostanze tra cui: proteine, lipidi, cellulosa e zuccheri.

Il metabolismo di fase I ha come scopo quello di ossidare gli inquinanti e renderli maggiormente solubili in acqua mentre il metabolismo di fase II li lega a sé con lo scopo di trasportare questi all'esterno della cellula.

I funghi utilizzati in questa procedura di biorisanamento sono di due tipologie: i macrofunghi della specie *Pleurotus ostreatus* presenti inizialmente per favorire lo sviluppo dei microfunghi: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Mucor* utilizzati successivamente per la degradazione vera e propria.

1.4 Obiettivi

L'obiettivo principale di questa tesi è quello di presentare l'efficacia e sostenibilità della tecnica di biorisanamento applicata ai primi 50 centimetri di suolo in una zona residenziale e analizzarne i sottoprodotti di degradazione quali idrossidi e chinoni attraverso un campionamento che verrà presentato nel paragrafo 2.2.2.

Il vantaggio della *mycoremediation* rispetto alle tecniche normali di bonifica riguarda il basso impatto ambientale che questa metodologia presenta. La bonifica dei suoli che viene comunemente eseguita (*Dig & Dump*) prevede: lo scavo tramite escavatori di medie/grandi dimensioni, il trasporto tramite camion e lo smaltimento in discarica. Invece, per quanto riguarda questa tecnica di biorisanamento, che avviene completamente in situ, non presenta una movimentazione di terra da parte di grossi macchinari ma viene soltanto eseguita una fresatura del terreno e successivamente vengono inoculati i microfunghi. La procedura verrà presentata più in dettaglio nei paragrafi successivi.

Gli svantaggi legati a questa metodologia sono legati ai tempi di esecuzione che talvolta possono risultare molto lunghi, poiché, la velocità di produzione degli enzimi da parte dei microfunghi è legata a più fattori quali umidità del suolo e temperatura ambientale.

Comunque, considerato l'alto impatto ambientale, uditivo e visivo dovuto alla movimentazione di macchinari pesanti, l'utilizzo della *mycoremediaton* in zone residenziali è considerato un fattore fondamentale per quanto riguarda la sostenibilità di questa tecnica.

2.0 Materiali e metodi

2.1 Inquadramento storico e geografico

L'area di intervento interessata è denominata "Ex Cave Casarin" a Nord di Mestre, fig. 2.1, situata a ridosso del Viale don Luigi Sturzo. L'intera zona è inserita in un contesto urbano in cui sono presenti diverse realtà sociali quali: la Parrocchia di San Pietro Orseolo, la Scuola dell'infanzia "M. Margotti", un supermercato, l'Hotel Albatros, e numerose abitazioni private condominiali, come si può vedere dalla fig. 2.2 in cui è delimitato il perimetro della ex cava.

A fine ottobre 2025, grazie all'accesso ai finanziamenti europei nell'ambito del PNRR – Siti Orfani, il Comune di Venezia ha avviato i lavori di bonifica, con misure di messa in sicurezza, di un ulteriore lotto dell'area residenziale, denominato "Lotto 2 Conclusivo". L'intervento di bonifica si è concluso regolarmente nel giugno 2026, ed è stato eseguito con metodologia *Dig & Dump*, che ha previsto lo scavo fino alla profondità di 1 m, lo smaltimento, il recupero dei terreni contaminati e il ripristino delle superfici mediante rinterro con terreno conforme alle CSC.

Nell'area in rosso, fig. 2.3, è stata effettuata una bonifica tramite lo scavo e smaltimento, da mezzo metro fino ad un metro da piano campagna; invece, nell'area verde è stata eseguita la *mycoremediation*.

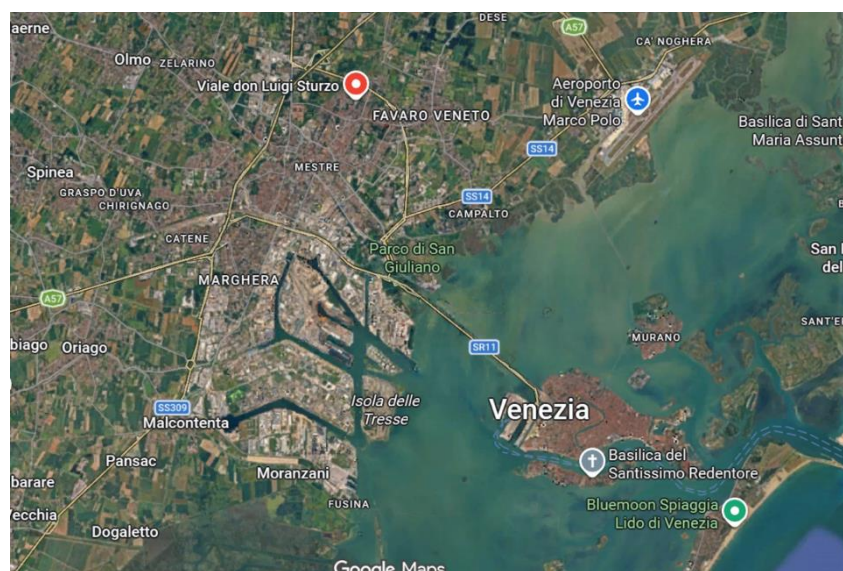


Figura 2.1: Localizzazione sito di interesse nel Comune di Venezia



Figura 2.2: Perimetro della ex cava di interesse



Figura 2.3: L'area in rosso soggetta alla normale bonifica Dig & Dump e l'area in verde soggetta a mycoremediation

Storicamente questa zona era un sito per l'estrazione di argilla. Poco più distante sorgeva la fornace Carlo Casarin, dove veniva cotta e trasformata in mattoni chiamati anche “laterizi”, largamente utilizzati nella costruzione di edifici, sia a Venezia che a Mestre e dintorni, già impiegati a partire del XIII secolo per evitare l'uso del legno che portava spesso ad incendi.

La fornace, e conseguentemente anche la cava, è stata chiusa all'inizio degli anni '80 con un successivo imbonimento della zona mediante l'utilizzo del materiale di scarto delle lavorazioni prodotte in fornace. Nella fig. 2.4 possiamo vedere l'entrata della fornace Carlo Casarin in Via Don Sturzo.



Figura 2.4: Entrata della fornace Carlo Casarin (fonte gruppo Facebook “Noi di Carpenedo”)

2.2 Indagini geofisiche e campionamenti

Una prima indagine geofisica è stata eseguita nel 2023 tramite l'utilizzo di un georadar per l'individuazione di sottoservizi che possono essere di varia natura: cavi telefonici, tubazioni non visibili o tombini coperti da materiale vegetale. Nell'Allegato 2 possiamo osservare in che modo il georadar ha coperto l'area interessata. L'utilizzo di questo strumento è necessario allo svolgimento della seconda indagine geofisica in cui è stata

studiata la stratigrafia del sito in esame, in data 06/08/2020 come possiamo vedere nell'Allegato 2.

Il campione di suolo è stato estratto fino ad una profondità di 1,2 metri dal piano campagna tramite una perforatrice idraulica Beretta T45. La carota di sedimento estratta presentava una morfologia limosa debolmente argillosa. Tale carota è servita per determinare le caratteristiche geotecniche del suolo (peso in volume, granulometria porosità, conducibilità e TOC) tramite analisi di laboratorio specifiche che possiamo vedere nell'Allegato 2.

Un'ultima indagine utile all'esecuzione dell'Adr, che vedremo nel paragrafo 2.8, è l'individuazione della zona satura, ovvero quanto è profonda dal piano campagna la prima falda, questa viene effettuata tramite la creazione di pozzi piezometrici nell'area di interesse ed in seguito viene misurata la soggiacenza dell'acquifero tramite una cordella piezometrica. Nell'Allegato 2 troviamo una mappa di tutti i piezometri nell'area di bonifica.

2.2.1 Campionamenti storici Veritas

Per avere una conoscenza dello stato del sottosuolo durante gli anni, Veritas ha eseguito cinque campagne di campionamento durante i seguenti anni: 2006-2008 (PP5, S2), 2018 (D1, D2, D3), 2020 (T9), 2022 (R5, R6, R7) e 2023 (M1, M2).



Figura 2.5: Localizzazione dei campionamenti esplorativi dal 2006 al 2023

La localizzazione dei punti è riportata in fig. 2.5 mediante il supporto del software QGIS 3.8, fondamentale per lo sviluppo dei progetti di bonifica.

Tutti i campionamenti sono stati eseguiti attraverso l'utilizzo di una trivella manuale che possiamo vedere in fig. 2.6. I campioni hanno una rappresentatività puntuale, ovvero riportano lo stato del sottosuolo nel punto in cui sono stati prelevati tranne per i punti D1, D2 e D3 per i quali è stata eseguita una manipolazione dei campioni che prevedeva la quartatura, ovvero una tecnica volta ad omogenizzare i campioni per avere un solo campione rappresentativo della zona (D) secondo il metodo IRSA-CNR (Quaderno 64, gennaio 1985). È una tecnica non complessa, infatti i campioni prelevati vengono stesi su un telo in PVC, mescolati e suddivisi in quattro settori, si prelevano due settori opposti e si procede in questo modo almeno due o tre volte, rimescolando accuratamente i nuovi campioni ottenuti.

Nell'Allegato 3 sono presentati i risultati delle campagne di monitoraggio eseguite dal 2006 al 2023 dal laboratorio AGROLAB Italia S.r.l (VI) e nei laboratori di analisi presso Veritas S.p.A, certificate e accreditate secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018, utilizzando il metodo EPA 3550C 2007 ed EPA 8270E 2018.

In giallo sono evidenziati i valori che superano i valori di CSC presenti in Tab. 1.1 al paragrafo 1.2.

A seguito dei risultati ottenuti dai campionamenti esplorativi, si è dovuta eseguire un'analisi di rischio nella zona d'indagine, per calcolare successivamente le CSR, che vedremo nel paragrafo 2.8, e confrontarle con i valori presenti nell'Allegato 2.



Figura 2.6: Trivella manuale utilizzata per i campionamenti esplorativi di terreno

2.2.2 Campionamento indipendente

In parallelo a quanto precedentemente presentato, il sottoscritto ha eseguito un campionamento indipendente da quello di Veritas Spa e DESAM poiché si è ritenuto opportuno sviluppare e mettere in pratica le competenze acquisite durante gli anni di studio per quanto riguarda sia il campionamento che le analisi in laboratorio.

Il campionamento indipendente è stato eseguito il 18 giugno 2026 alle ore 10:00, in concomitanza con DESAM, anch'essa presente per accertarsi lo stato d'avanzamento della *mycoremediation*. Diversamente dai prelievi fatti in passato, nel campionamento sono stati eseguiti due diversi transetti nell'area di interesse.

Il primo transetto è rappresentato dalla lettera A ed è composto da 3 campioni diversi numerati in ordine crescente, mentre il secondo transetto è rappresentato dalla lettera B e anche questo è composto da tre campioni diversi numerati, come possiamo vedere dalla fig. 2.7.

Il materiale utilizzato per il campionamento è il seguente: sei vaschette monouso di alluminio, guanti in nitrile, paletta in metallo per il prelievo dei campioni di suolo, rotolo di alluminio, indelebile per marcare le vaschette e borsa isolante per il trasporto che possiamo vedere nella fig. 2.8. Il materiale raccolto è stato posto in freezer a una temperatura compresa tra i -2 e -6 C°.



Figura 2.7 e Figura 2.8: Punti di campionamento suddivisi in transetto A e transetto B e materiali utilizzati

2.3 Inoculo microfunghi

Il terreno interessato alla bonifica ha un'estensione di circa 2.800 m² e una profondità dal piano campagna di circa 50 cm.

L'area è stata inizialmente sottoposta a fresatura tramite motocoltivatore per i primi 20-30 cm di suolo, successivamente è stata coperta da un substrato di origine vegetale, nel nostro caso paglia compressa a formare dei panetti di dimensioni 50x40x30 cm del peso variabile (dai 20 ai 30 Kg) che hanno dovuto coprire ciascuno un'area di circa 4 m².

Sono stati utilizzati circa 700 panetti come possiamo vedere dalla fig. 2.9 Essi già contenevano il fungo edule di tipo *Pleurotus ostreatus*; quindi, un primo inoculo è stato già eseguito inizialmente. A seguito della posa e scarto dell'involucro di plastica dei panetti, è stata eseguita una seconda fresatura del terreno per omogenizzare il substrato ligneo con il suolo sottostante.

I microfunghi autoctoni interessati sono di quattro generi diversi: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Mucor*. Essi sono stati isolati e selezionati dal laboratorio DISTAV dell'Università di Genova nel progetto pilota eseguito nel 2023 nella medesima area.

È stata creata una soluzione a concentrazione nota di questi microfunghi in laboratorio e trasportata su sito di bonifica mediante due taniche da 90 e 30 litri a una concentrazione



Figura 2.9: Posa dei panetti contenenti i microfunghi

di 10^9 UFC/m³. Successivamente la soluzione è stata diluita con acqua potabile sul campo mediante l'utilizzo di due bulk, ovvero grossi contenitori di polietilene ad alta densità (HDPE), di un volume pari a 1000 litri per la prima tanica e 500 litri per la seconda. I bulk sono stati svuotati per l'irroramento nella zona di interesse attraverso l'utilizzo di un innaffiatoio. Infine, la zona di interesse è stata irrigata con acqua proveniente dall'acquedotto, per un consumo idrico totale di 2 m³, per agevolare la penetrazione della soluzione nel suolo e mantenere un'umidità elevata dello stesso per favorire lo sviluppo dei funghi.

2.4 Enzimi intracellulari ed extracellulari

Citocromo P450 mono-ossigenasi

Gli enzimi del citocromo P450 (CYP450) sono un gruppo eterogeneo di emoproteine tiolate che presentano una struttura quaternaria, sono prevalentemente presenti nel reticolo endoplasmatico. È presente un gruppo -emo formato dalla molecola protoporfirina, la cui struttura possiamo vederla in fig. 2.10, è coordinato al centro uno ione di Fe³⁺ che a sua volta è legato ad un gruppo tiolato -SH e ad una molecola di acqua. La funzione principale del CYP450 è quello di trasformare le molecole di IPA, che sono liposolubili, in molecole maggiormente polari e idrosolubili con il seguente meccanismo di reazione chiamato: metabolismo di fase I.

Quando il contaminante entra all'interno della cellula verrà a legarsi con la ferro protoporfirina al posto della molecola d'acqua modificando il potenziale di ossidoriduzione del ferro, l'enzima NADH reduttasi ridurrà il Fe³⁺ a Fe²⁺. Una molecola di ossigeno biatomico si lega al ferro, avviene un altro trasferimento di elettroni formando un perossido instabile, si rompe il legame tra i due ossigeni e uscirà una molecola d'acqua ottenendo una specie molto attiva e ossidante che è il Fe⁴⁺ legato ad un atomo di ossigeno. Questa specie ossidante andrà a prendere un atomo di idrogeno dalla struttura dell'IPA e lo sostituirà con l'atomo di ossigeno legato a sé, ossidando l'inquinante.

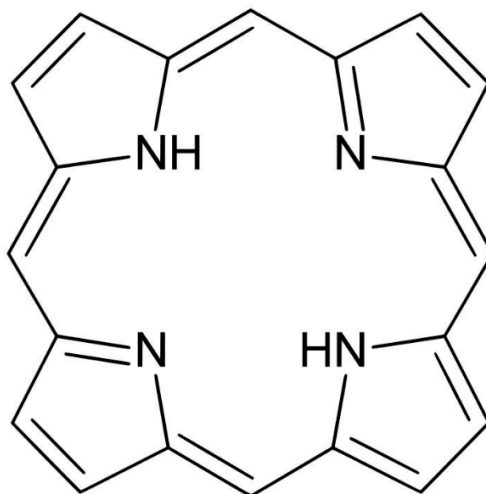


Figura 2.10: Struttura chimica della proto-porfirina

Glutathione

Il glutathione è una molecola endogena idrofilica (Dasari *et al.*, 2018) che si trova principalmente nel citosol della cellula fungina e viene utilizzata a seguito del metabolismo di fase I, chiamato metabolismo di fase II.

Il glutathione in fase ridotta (GSH), che possiamo osservare in fig. 2.11, lega a sé la molecola di IPA. Questa reazione è catalizzata dall'enzima Glutathione S-transferasi (GST) che ne agevola la reazione (Dasari *et al.*, 2018), GST ha il compito di trasformare il GSH in un nucleofilo forte (GS^-) capace di attaccare l'inquinante.

Il gruppo tiolico -SH del GSH, quindi, attacca la molecola di IPA rendendo il complesso maggiormente idrosolubile e facilmente trasportabile all'esterno della cellula.

Questa reazione è comune in tutte le specie animali, soprattutto nell'uomo in cui questa molecola è prodotta dal fegato per la detossificazione dei composti xenobiotici.

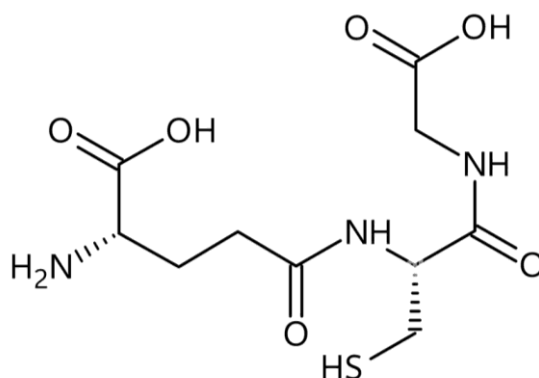


Figura 2.11: Struttura chimica del glutatione

Gli enzimi extracellulari interessati alla degradazione degli idrocarburi sono i medesimi che sono impiegati per la rottura delle macromolecole organiche presenti in natura, quali: lignina, cellulosa, cheratina e melanina. La maggior parte dei funghi lignolitici, chiamati anche “*white-rot fungi*” o “basidiomiceti” (Rani *et al.*, 2024) producono principalmente due diversi tipi di enzimi lignolitici: fenolossidasi (Laccasi) e perossidasi emocoordinate (Lignina Perossidasi, Manganese Perossidasi e Perossidasi Versatile). La differenza sostanziale tra i due tipi di enzimi è che i fenolossidasi utilizzano l’ossigeno molecolare come accettore di elettroni mentre le perossidasi utilizzano i perossidi. Questi ultimi si suddividono in tre tipi di enzimi extracellulari con un alto potenziale di ossido-riduzione.

Lignina perossidasi (LiP)

Questo enzima, definito anche hemo-proteina monomerica (Falade *et al.*, 2016) la cui struttura possiamo vederla nella fig. 2.12, è utilizzato dai basidiomiceti principalmente per rompere le lunghe catene polimeriche di lignina ottenendo l’energia necessaria per la crescita e sviluppo. La sua applicazione viene tutt’oggi studiata in svariati ambiti quali: bioraffinerie, concerie e depurazione acque. Nel nostro caso, LiP prodotto dai microfunghi, non avendo una specificità di azione di ossidoriduzione (Rani *et al.*, 2024), rompe sia la struttura della lignina che i composti aromatici presenti nel terreno.

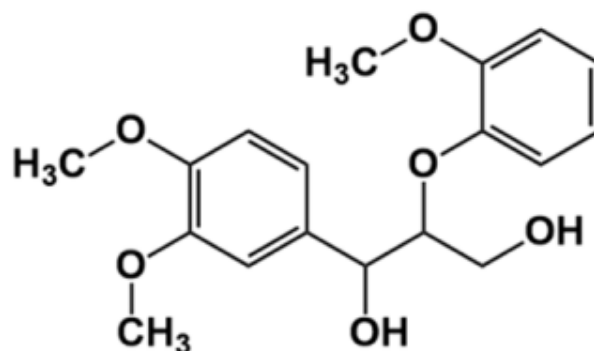


Figura 2.12: Struttura chimica della Lignina Perossidasi

Nella fig. 2.13 vediamo come agisce l'enzima LiP, il ciclo catalitico inizia quando un perossido, generalmente H_2O_2 , si lega alla molecola ferroprotoporfirina (Kulikova *et al.*, 2011) formando il I Complesso-Lip producendo una molecola di acqua.

Lo step successivo prevede che I complesso potrà prendere un elettrone per stabilizzarsi, da un composto che potrà essere un idrocarburo policiclico aromatico oppure, come vediamo in fig. 2.13, dal *veratryl alcol*, un metabolita necessario alla LiP per evitare un'inattivazione da parte del perossido (Kulikova *et al.*, 2011).

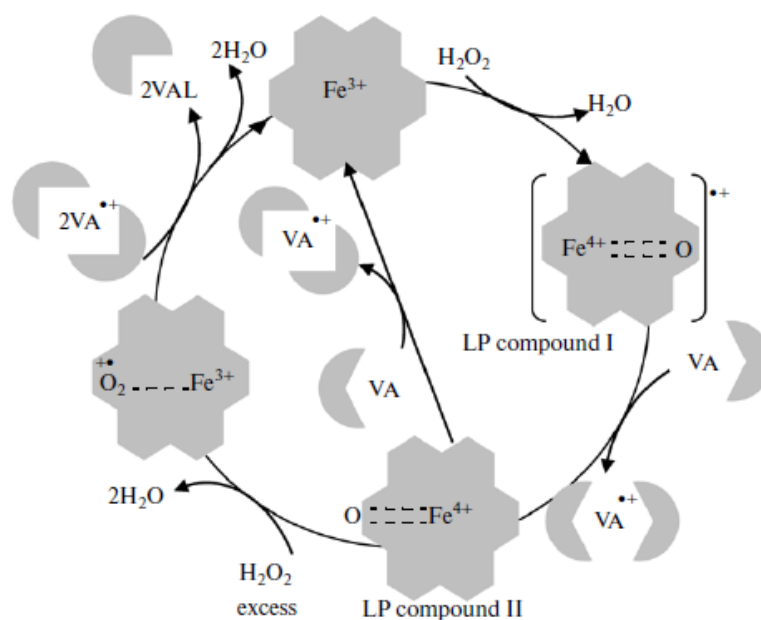


Figura 2.13: Ciclo enzimatico della LiP

Manganese perossidasi (MnP)

Come l'enzima LiP, anche MnP è un'emoproteina monomerica, fig. 2.14, prodotta principalmente dai basidiomiceti ma con la sostanziale differenza che MnP utilizza come substrato per il proprio ciclo catalitico lo ione Mn^{2+} il quale verrà ossidato a ione Mn^{3+} (Hofrichter, 2002). Il ciclo catalitico inizia quando un perossido, generalmente H_2O_2 , si lega all'enzima ferroprotoporfina formando il I Complesso-MnP producendo una molecola di acqua, lo ione Mn^{2+} si ossida a Mn^{3+} donando un elettrone al Complesso-MnP, lo ione Mn^{3+} si riduce nuovamente a Mn^{2+} producendo un radicale $\text{R}^\bullet$ e potrà estrarre, in maniera indifferenziata da molecole organiche, nel nostro caso IPA, a basso potenziale di ossido-riduzione, un elettrone o aggiungere uno ione H^+ . La Fig. 2.15 descrive graficamente questo ciclo.

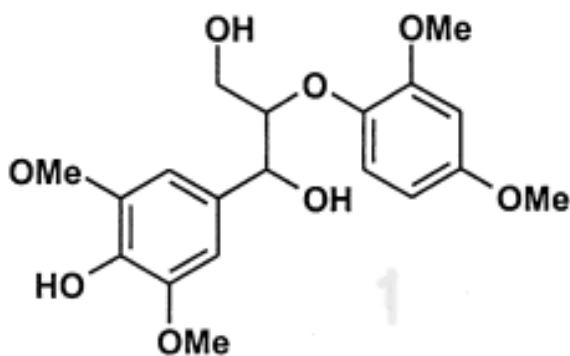


Figura 2.14: Struttura chimica dell'enzima Manganese perossidasi

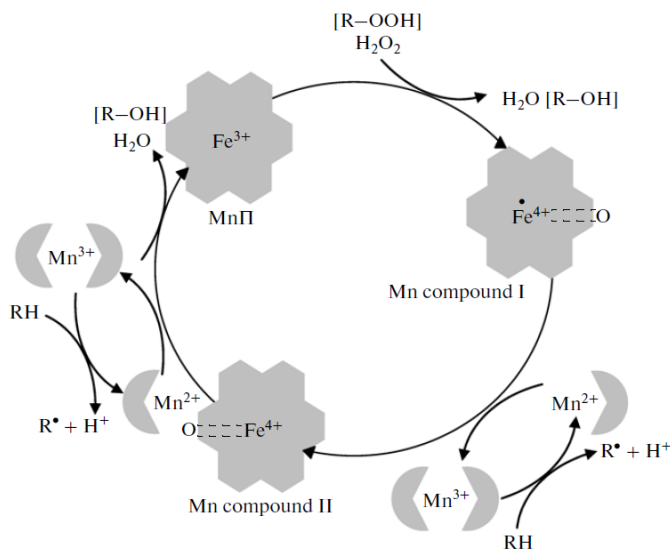


Figura 2.15: Ciclo enzimatico della Mn-perossidasi

Perossidasi versatile (VP)

Questa famiglia di glicoproteine è tutt'ora poco studiate, la loro caratteristica è quella di avere proprietà ibride tra gli enzimi LiP e MnP; infatti, esse catalizzano le reazioni redox sia dallo ione Mn^{2+} che dal *veratryl alcol* (Kulikovab *et al.*, 2011) con un ciclo enzimatico molto simile.

Laccasi (Lac)

L'enzima Laccasi appartiene alla famiglia della proteina “*multi-copper*” (Agrawal *et al.*, 2018) definita così poiché, come possiamo vedere dalla fig. 2.16, presenta quattro ioni di rame (Cu^{+}) suddivisi in tre tipi differenti di struttura: Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3.

Lac presenta la capacità di ossidare un vasto numero di composti sia aromatici che non-aromatici. La sua peculiarità, rispetto agli enzimi visti in precedenza, è che non utilizza perossidi per iniziare il ciclo enzimatico ma utilizza ossigeno biatomico O_2 per ossidare i composti interessati.

Il Tipo 1, chiamato anche “*paramagnetic blue copper*”, presenta un alto potenziale di ossidoriduzione, +790 mV circa, dovuto al legame covalente tra il rame e la cisteina (Cys), ed è proprio in questo sito che avviene la reazione di ossidazione del substrato (Agrawal *et al.*, 2018), il resto della struttura è caratterizzata da due ligandi di istidina e un ligando, solitamente variabile, di leucina.

Il Tipo 3 è caratterizzato da due ioni di rame legati da sei istidine esterne (la forma che vediamo in fig. 2.16 è quella ossidata), a differenza del Tipo 2 che presenta un solo ione di rame a cui è legato due istidine e una molecola di acqua. Gli ultimi due tipi formano un cluster tri-nucleare (Agrawal *et al.*, 2018) dove l'ossigeno molecolare si riduce.

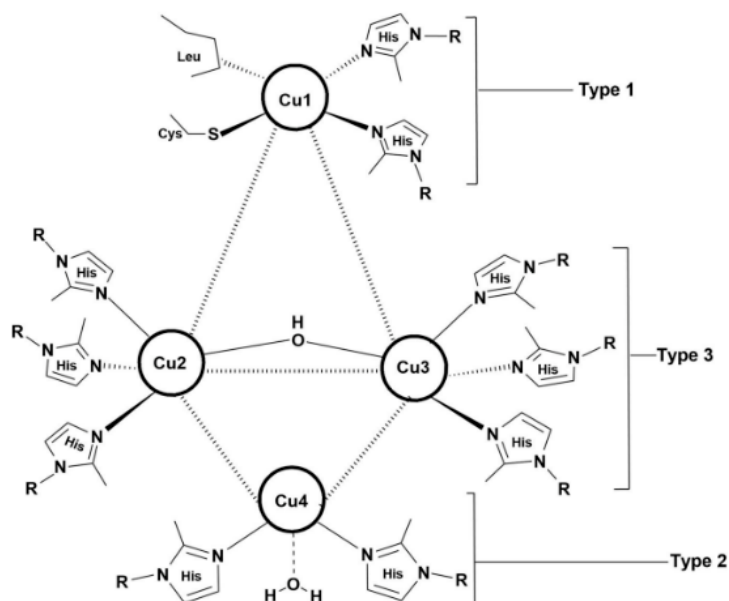


Figura 2.16: Struttura chimica della laccasi con le tre regioni

2.5 Trasformazioni biochimiche

In questo paragrafo si vuole presentare le diverse trasformazioni nella degradazione degli IPA. Data la complessità del discorso e dalla moltitudine dei percorsi biochimici che si possono verificare in ambiente, verranno descritti solo alcuni processi e metaboliti che interessano una porzione ridotta di degradazione degli IPA.

È fondamentale tenere conto delle concentrazioni presenti nel sito di bonifica, poiché la degradazione dei diversi inquinanti produce, come vedremo nei prossimi paragrafi, una moltitudine di metaboliti, talvolta molto tossici (Zang *et al.*, 2007). Infatti, in questo studio del 2007, sono stati eseguiti diversi test sul benzo[a]pirene a concentrazioni differenti: 10, 30, 60, 90, 120, 150 mg/l ma i risultati non sono applicabili al nostro caso di studio in quanto le concentrazioni iniziali di BaP sono minori di 1 mg/l.

Come esempio di degradazione, vengono descritte in seguito le diverse modifiche associate al pirene, portando alla creazione di un numero di metaboliti molto elevato, in questo studio ne sono stati studiati uno per il pirene e due per il benzo[a]pirene.

Le reazioni che gli IPA possono subire a opera gli enzimi intra/extra cellulari sono molteplici, come per esempio le reazioni di metilazione/ossidazione sui siti idrossilici che

portano alla rottura dei legami C-C dell'anello benzenico, però il meccanismo con cui gli enzimi agiscono per ossidare l'anello sono i medesimi.

Come prima trasformazione abbiamo quattro meccanismi di reazione che avvengono in maniera sequenziale: il primo prevede un'idrossilazione (formazione di un gruppo idrossilico -C-OH) sui siti attivi delle molecole portando alla creazione del 1-idrossipirene, il secondo è un'ossigenazione (formazione di un gruppo carbonilico -C=O) che porta alla formazione diretta di un chinone (Farraj *et al.*, 2020), il terzo è una scissione ossidativa della molecola di IPA il quale prevede la rottura dell'anello benzenico portando alla formazione di acidi carbossilici e il quarto è la decarbossilazione ossidativa che vede la scissione del legame C-C con la produzione conseguente di CO₂ (Wirasnita and Hadibarata, 2016). Quanto descritto è rappresentato in fig. 2.17.

In questo studio sono stati analizzati i tre diversi metaboliti: 1-idrossipirene, 3-idrossibenzo[a]pirene, 7-idrossibenzo[a]pirene.

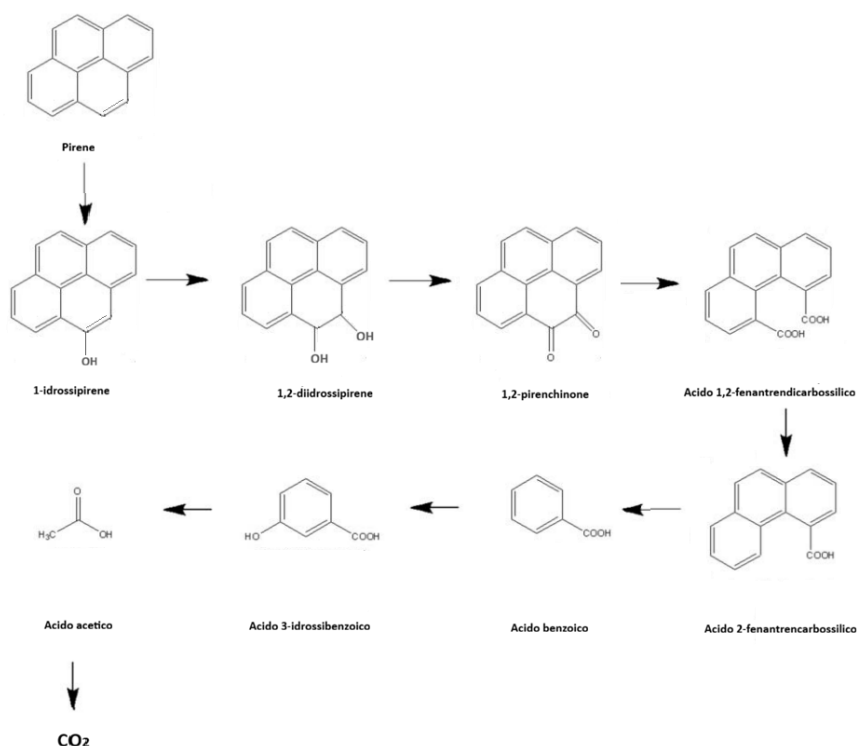


Figura 2.17: Formazione di CO₂ attraverso il processo di degradazione favorito dai basidiomiceti

2.6 Monitoraggio operativo

La zona di interesse è stata suddivisa in tre aree, chiamate anche parcelle, mediante l'utilizzo dei poligoni di *Thiessen* i quali prevedono la creazione di segmenti chiusi, all'interno della zona selezionata, di area uguale per facilitare l'acquisizione dei dati chimico-fisici. I poligoni possiamo vederli nel paragrafo 2.2.1, fig. 2.5, rappresentati dalla linea verde chiaro.

Per il monitoraggio della tecnica di biorisanamento è fondamentale misurare l'umidità presente all'interno del suolo, poiché una secchezza troppo elevata della zona comporterebbe la morte delle popolazioni fungine.

Questa è stata effettuata attraverso due metodologie diverse: misurazioni in continuo tramite igrometro fisso e misurazioni manuali tramite igrometro portatile.

L'igrometro portatile è utile per misurare le zone in cui il terreno è esposto maggiormente alla radiazione solare, mentre le misurazioni in continuo sono utili per monitorare l'area complessiva.

I sensori in continuo ECH20 modello 10HS, sono stati forniti dalla società Meter Group, per un totale di 3 unità. Questi sono stati posizionati nelle tre diverse parcelle e collegati ad un *datalogger*, modello ZL6, collegato alla piattaforma web *Zentra Cloud*. L'acquisizione dei dati da remoto è stata eseguita con un tempo di rilevazione pari a 15 minuti. La strumentazione appena descritta possiamo vederla in fig. 2.18.

L'efficacia dell'intervento è stata monitorata attraverso dei campionamenti di suolo eseguiti con frequenza ben precisa: prima dell'aggiunta dei panetti, dopo 15-30 giorni dall'inoculo e dopo 30 giorni dall'innalzamento delle temperature sopra i 15 °C.

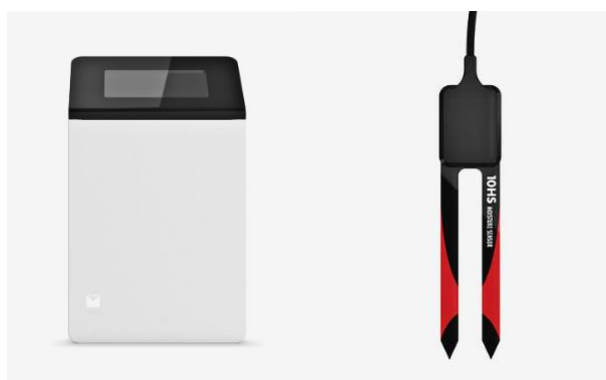


Figura 2.18: Datalogger ZL6 e igrometro fisso 10HS

2.7 Analisi in laboratorio

L'analisi degli IPA contenuti nei sedimenti prelevati è stata eseguita nei laboratori di Ca' Foscari, nell'edificio Epsilon, primo piano, con il supporto della ricercatrice dell'Istituto di Scienze Polari Elena Argiradis.

La determinazione degli IPA viene eseguita periodicamente in diverse matrici ambientali ma con diversi protocolli di laboratorio. Gli analiti coinvolti in questa tesi sono stati analizzati seguendo il protocollo EPA 3550C 2007 ed EPA 8270E 2018 per quanto riguarda le analisi condotte da Veritas.

L'analisi indipendente descritta in questo paragrafo, invece, descrive come è stata svolta la preanalitica e successiva analisi dei campioni di sedimento in laboratorio universitario. La tecnica analitica usata che è stata utilizzata nelle analisi è la *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

La separazione degli IPA avviene in una colonna cromatografica lunga diverse decine di metri e si basa sull'incremento discreto di temperatura nella colonna che porterà in fase vapore i composti a basso peso molecolare, uscendo per primi; mentre i composti più pesanti e ingombrati stericamente usciranno dopo, questo ci permetterà una determinazione sequenziale dei contaminanti attraverso la spettrometria di massa. Il segnale analitico ottenuto da questa tecnica è chiamato TIC (*Total Ion Chromatography*). Nella Tab. 1.3 possiamo vedere i diversi tempi di ritenzione (RT) della gascromatografia ottenuti dal software *Agilent MassHunter Quantitative Analysis*.

Tabella 1.3: Tempi di ritenzione nelle analisi indipendenti

Compound Meth...	FR PAH 1	BIANCO 1...	BIANCO 2...	A1 PAH	A2 PAH	A3 PAH	B1 PAH	B2 PAH	B3 PAH
Name	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT
NAP	4,975	4,958	4,952	4,958	4,958	4,952	4,947	4,952	4,952
ACY	7,374	7,369	7,374	7,375	7,374	7,374	7,369	7,374	7,374
ACE	4,450	4,415	4,415	4,416	4,415	4,415	4,415	4,415	4,415
FLU	8,475	8,491	8,491	8,492	8,487	8,483	8,471	8,484	8,483
PHE	10,409	10,407	10,407	10,407	10,403	10,403	10,404	10,400	10,398
FLA	13,548	13,566	13,566	13,547	13,537	13,537	13,548	13,538	13,537
CHR	17,942	17,940	17,960	17,950	17,940	17,940	17,951	17,942	17,931
BbF	21,646	22,057	22,063	21,638	21,632	21,632	21,664	21,628	21,623
1-OH-PYR		18,126	18,126	18,087	17,979	18,116	18,078	18,078	17,784
PYR	14,095	14,103	14,103	14,094	14,084	14,084	14,095	14,085	14,084
ANT	10,544	10,573	10,407	10,569	10,551	10,551	10,531	10,548	10,542
BkF	21,763	22,057	22,063	21,768	21,753	21,753	21,757	21,751	21,738
BghiP	27,493	27,387	27,387	27,492	27,485	27,495	27,513	27,483	27,472
DBaH	27,034	27,231	27,241	27,062	27,036	27,036	27,015	27,025	27,013
3-OH-BaP		27,241	27,241	26,838	27,231	27,134	26,810	27,230	27,218
BaA	17,844	17,940	17,960	17,843	17,833	17,833	17,834	17,834	17,931
BaP	22,900	22,892	22,895	22,899	22,886	22,889	22,909	22,885	22,877
PERY	23,268	22,892	22,895	22,899	23,278	22,889	23,256	23,283	23,269
IND	26,839	26,802	26,743	26,838	26,821	26,831	26,839	26,820	26,809
7-OH-BaP		27,241	27,241	27,902	27,231	27,592	27,425	27,230	27,218

L'analizzatore utilizzato è un quadrupolo singolo accoppiato ad una sorgente ad impatto elettronico (EI) operante a 70eV, è una tecnica di ionizzazione “hard” in cui l'energia fornita dalla sorgente è maggiore rispetto a quella necessaria per ionizzare i nostri composti. L'elettrone porterà via un altro elettrone presente nei nostri analiti ionizzando gli stessi.

Dopo esser stati ionizzati, i composti entrano all'interno dell'analizzatore il quale è formato da tre quadrupoli: il primo e il terzo prevedono la separazione degli ioni in base al loro rapporto m/z , mentre il secondo è utilizzato come camera di impatto in cui gli analiti frammentano, attraverso lo scontro con gas quali N_2 ed He, in ioni secondari. Infine, il nostro analizzatore è impostato in scansione SIM (*Selected-Ion Monitoring*) ovvero avviene una scansione mirata per ogni ione d'interesse.

Come primo passo, i campioni sono stati liofilizzati per 24 ore tramite liofilizzatore LIO-5P Digital[®], in cui un alto vuoto e basse temperature (nel nostro caso 4-7 millibar a una temperatura di -40 °C) favoriscono il processo di sublimazione con l'obiettivo di diminuire il più possibile il contenuto di acqua all'interno dei sedimenti evitando di riscaldare i campioni e preservando la matrice nel suo complesso.

Per le analisi in GC-MS degli IPA e dei tre metaboliti indagati è stato necessario preparare degli standard interni ad una concentrazione di 1 ppm per il successivo spiking nei bianchi e campioni.

Le soluzioni madri per gli standard interni, che possiamo vedere nella fig. 2.19, erano presenti in concentrazioni diverse:

- 1-idrossipirene marcato D9 a 1000 ppm;
- 3-idrossibenzo[a]pirene marcato D11 a 500 ppm;
- 3-idrossibenzo[a]pirene a 1000 ppm;
- 1-idrossipirene a 1000 ppm;
- 7-idrossibenzo[a]pirene a 2000 ppm.



Figura 2.19: Soluzioni madre degli standard interni a diverse concentrazioni

Per il calcolo del volume da prelevare da ogni soluzione madre con lo scopo di raggiungere la diluizione desiderata di 50 ppm, è stata utilizzata la seguente formula (6):

$$V1 \times C1 = V2 \times C2 \rightarrow (6)$$

I materiali utilizzati per la diluizione dei nostri standard interni sono i seguenti:

- una micropipetta automatica da 50 µl;
- una micropipetta automatica da 100 µl;
- quattro puntali per la micropipetta da 50 µl;
- un puntale per la micropipetta da 100 µl;
- cinque matracci da 2 ml;
- cinque pipette Pasteur;
- cinque Vials per la misurazione in LC-MS.

Per assicurarsi la completa pulizia dei nostri strumenti di laboratorio, si è proceduto con una sterilizzazione di ogni singolo strumento (ago e puntali micropipette, matracci, Pasteur) mediante tre cicli di pulizia utilizzando inizialmente diclorometano (DCM) e successivamente esano.

Per la concentrazione di 2000 ppm, sono stati prelevati 50 µl mediante micropipetta automatica da 50 µl dalla soluzione madre, posti in un matraccio da 2 ml (2000 µl) e portati a volume con DCM. Nella soluzione madre a 1000 ppm sono stati prelevati 100

μl sempre con la micropipetta da 50 μl , dopo aver cambiato puntale, e posti nel matraccio da 2 ml, successivamente si è portato tutto a volume sempre con DCM. Per la soluzione madre a 500 ppm, si sono prelevati 200 μl utilizzando la micropipetta da 100 μl , posto nel matraccio da 2 ml ed infine si è portato anch'esso a volume.

Per l'analisi in GC-MS sono necessarie specifiche provette chiamate “vials”, le quali presentano un tappo con un setto poroso che permette all'ago dello strumento di prelevare il campione presente all'interno e iniettarlo nella colonna cromatografica. Gli standard sono stati trasferiti dal matraccio all'interno delle vials mediante pipette Pasteur, diverse per ogni composto. Il risultato finale possiamo vederlo nella fig. 2.20.



Figura 2.20: Vials con gli standard interni

La preparazione dei campioni è stata eseguita a seguito della completa liofilizzazione degli stessi. Per l'omogeneizzazione del sedimento si è utilizzato un mulino automatico, RETSCH RM 200[®], in cui dopo ogni ciclo di macinazione diverso per ogni campione, è stato pulito con DCM (ciotola, testa di macinazione e lama raschiante) facendo attenzione a non contaminare con acqua la strumentazione.

Per l'estrazione degli analiti dal sedimento è stata utilizzato il macchinario DIONEX ASE 350 *Thermo Scientific*[®] fig. 2.21. Questo utilizza dei contenitori in acciaio inossidabile per l'estrazione, chiamate celle di estrazione, le quali sono stati immerse in DCM e poste in un bagno ad ultrasuoni per circa dieci minuti per evitare ogni tipo di contaminazione che può derivare da analisi precedenti. Le celle sono formate da undici parti, cinque formano la parte superiore e sono uguali agli altri cinque che formano la parte inferiore, mentre l'ultimo è il cilindro che conterrà il nostro campione, quanto descritto possiamo vederlo in fig. 2.22.

Dopo aver assemblato le celle di estrazione, queste sono state poste singolarmente in una bilancia analitica per l'aggiunta, in ognuna di essa, di una porzione di campione. I risultati delle pesate possiamo osservarle nella tab. 1.4.



Figura 2.21: Estrattore ASE utilizzato



Figura 2.22: Componenti delle celle di estrazione

Tabella 1.4: Risultati delle pesate dei campioni

Campione	Peso (g)
A1	2,047
A2	2,019
A3	2,045
B1	2,003
B2	2,091
B3	2,336

A seguito delle pesate, sono state aggiunte in ogni cella di estrazione due spatole di sodio anidro (Na_2SO_4) per eliminare il contenuto di acqua che poteva essere sfuggito alla liofilizzazione. Successivamente è stato eseguito lo *spiking* dei nostri campioni con gli standard interni: 50 μl per il 3-idrossibenzo[a]pirene, 1-idrossipirene, 7-idrossibenzo[a]pirene e 100 μl per due standard deuterati D9 e D11.

Infine, è stata aggiunta la terra di diatomee fino a coprire completamente il cilindro della cella per aumentarne l'efficienza di estrazione. Il procedimento è stato analogo per i due bianchi, i quali sono stati posti nella cella di estrazione, eseguito lo *spiking* e riempiti di terra di diatomee.

I campioni ed i bianchi sono stati posti negli appositi alloggi del macchinario, in corrispondenza di ogni campione è stata posta una *falcon*, precedentemente pulita con DCM ed esano, ed è stata fatta partire l'estrazione mediante esano:DCM 1:1 ad una temperatura di 100 °C e pressione 1500 psi.

Conclusa l'estrazione, i campioni ed i bianchi sono stati concentrati con un flusso di azoto per due ore circa, fino a raggiungere un volume di 0,5 ml.

La purificazione dei nostri estratti è stata eseguita mediante otto diverse colonnine cromatografiche (due per i bianchi e sei per i campioni) contenenti: 0,5 g di silice neutra, precedentemente decontaminata e attivata in muffola a 400 °C per 4 ore. Le colonne sono state attivate facendo eluire DCM ed esano all'interno della stessa, successivamente sono stati introdotti i nostri campioni, uno per ogni colonna, aggiungendo ad ogni campione DCM/esano per una completa eluizione.

I campioni purificati sono stati riconcentrati con azoto fino ad un volume di circa 250 µl e posti nelle *vials* di raccolta. In seguito, è stato aggiunto un composto, 100 µl tramite micropipetta, derivatizzante chiamato BSTFA (trimetilsilil-trifluoroacetamide), il quale ha come obiettivo quello di sostituire i gruppi ossidrilici con dei gruppi trimetilsilici, aumentando la volatilità della sostanza. La derivatizzazione permette l'analisi di composti che normalmente non sarebbero analizzabili in GC-MS.

Infine, i nostri sei campioni e i due bianchi sono stati inseriti all'interno del macchinario Agilent Technologies 7890A-5975C GC-MS presente in laboratorio universitario.

I parametri del macchinario sono i seguenti: colonna cromatografica Agilent 122-5531 DB-5ms 30 m x 250 µm x 0.1 µm, un iniettore splitless a una temperatura di 270 °C, una pressione di 8.752 psi e un flusso costante di 54 mL/min. Di seguito sono riportati i passaggi di temperatura del GC-MS durante l'analisi:

- *run time* 34.083 min;
- *post run time* 10 min a 315 °C;
- *setpoint* iniziale 70 °C;
- aumento di 15 °C/min fino a 180 °C
- *hold time* 2 min
- 10 °C/min fino a 220 °C;
- *hold time* 0.5 min;
- aumento di 5 °C/min fino a 250 °C;
- *hold time* 2 min;
- aumento di 8 °C/min fino ad 300 °C;
- *hold time* 5 min.

Le aree ottenute sono state integrate ed elaborate mediante il supporto delle maschere in Excel fornite dalla dottoressa Argiradis Elena per il calcolo delle concentrazioni assolute in ng all'interno di ogni bianco e campione. Di seguito sono riportate le equazioni utilizzate per il calcolo del Fattore di Risposta (FR) (1) e per la determinazione in ng assoluti del nostro analita (8).

$$FR_i = \frac{A_i \cdot C_{is}}{A_{is} \cdot C_i} \quad (1)$$

$$Q_x = \frac{A_x \cdot Q_{is}}{A_{is} \cdot FR_i} \quad (2)$$

- A_i = Area analita;
- A_{is} = Area standard interno marcato;
- C_{is} = Concentrazione standard interno marcato;
- C_i = Concentrazione analita;
- Q_{is} = Massa in ng standard interno marcato;
- Q_x = Massa analita nel campione.

A seguito della determinazione delle quantità assolute degli analiti presenti nei bianchi e campioni, è stato sottratto il valore medio dei due bianchi al corrispettivo in ogni singolo campione.

Infine, per calcolare la concentrazione nei sei campioni, si è diviso il peso assoluto dei composti per le pesate dei campioni viste nella tab. 1.4 ottenendo la concentrazione in ng/g.

Per ricondurre la concentrazione in mg/Kg è bastato dividere il nostro risultato per 1000.

2.8 Analisi di Rischio

La valutazione sito specifica della pericolosità dei contaminanti presenti nelle matrici ambientali è di fondamentale importanza nelle aree che devono essere soggette a bonifica, è al momento una delle procedure più avanzate per la valutazione del grado di contaminazione di un'area (APAT "Criteri metodologici per l'applicazione dell'analisi assoluta di rischio nei siti contaminati" 2008). Ha come obiettivo quello di valutare gli effetti sulla salute umana, sia in un adulto che in un bambino, derivanti da un'esposizione prolungata al contaminante o ai contaminanti. Attenzione però, poiché, questa procedura non valuta molteplici situazioni quali: la pericolosità dovuta ad esposizioni a breve termine, la sicurezza nei cantieri di lavoro e un rischio dovuto ad una contaminazione diffusa (es. sorgenti non identificabili).

È condotta seguendo i criteri metodologici indicati da ISPRA in cui bisogna definire un Modello Concettuale del Sito basato su tre elementi principali: sorgente di

contaminazione, percorsi di migrazione degli inquinanti nelle matrici ambientali e i bersagli della contaminazione. Proprio in questo contesto si inseriscono due diverse tipologie di Adr:

- **Adr sanitario sito specifica**

Ha come scopo quello di analizzare gli effetti sulla salute umana derivanti dall'esposizione prolungata ai contaminanti nelle matrici ambientali.

- **Adr ambientale sito specifica**

Ha come scopo quello di analizzare il trasporto nelle acque di falda dal punto di contaminazione fino ai possibili recettori.

Il Rischio (R) è inteso come la probabilità di accadimento di un evento dannoso (P) moltiplicato per l'entità del danno provocato dall'evento stesso (D):

$$R = P \times D \quad (3)$$

Il danno conseguente all'evento incidentale (D), a sua volta, può essere dato dal prodotto tra un fattore di pericolosità (Fp), dipendente dall'entità del possibile danno moltiplicato per un fattore di contatto (Fe) o la durata di esposizione:

$$D = Fp \times Fe \quad (4)$$

Nel caso di siti inquinati, la probabilità (P) di accadimento dell'evento è certa (P=1), il fattore di pericolosità è dato dalla tossicità dell'inquinante (T) ed il fattore di contatto è espresso in funzione della portata effettiva di esposizione (E [mg (kg d)⁻¹]):

$$R = E \times T \quad (5)$$

Il risultato R viene poi confrontato con i criteri di accettabilità individuali e cumulativi del rischio sanitario, per decidere se esistono o meno condizioni in grado di causare effetti sanitari nocivi.

Il calcolo del rischio si differenzia a seconda che l'inquinante sia cancerogeno oppure non-cancerogeno. Per le sostanze cancerogene va la formula:

$$R = E \times SF \quad (6)$$

Dove R rappresenta la probabilità di casi incrementali di tumore nel corso della vita rispetto alle condizioni di vita usuali, SF (Slope Factor [mg (kg d)^{-1}]) indica la probabilità di casi incrementali di tumore nella vita per unità di dose. Per le sostanze non cancerogene vale invece la seguente equazione:

$$HQ = E / RfD \quad (7)$$

Dove HQ (*Hazard Quotient*) è un 'Indice di Pericolo' che esprime di quanto l'esposizione alla sostanza supera la dose tollerabile o di riferimento, RfD (*Reference Dose* [mg (kg d)^{-1}]) è la stima dell'esposizione media giornaliera che non produce effetti avversi sull'organismo umano durante il corso della vita.

Esistono due diverse modalità di ADR per la creazione di un modello concettuale preliminare:

- Modalità diretta (*forward mode*)

Permette di stimare, conoscendo la concentrazione in prossimità del punto di contaminazione, il rischio, e quindi la concentrazione massima, per i recettori esposti ad una certa distanza (*off-site*) e in vicinanza del luogo interessato (*on-site*).

- Modalità inversa (*backward mode*)

In questo caso si fissa la concentrazione massima per il recettore esposto e si calcola la massima concentrazione accettabile presente alla sorgente di contaminazione quindi la determinazione delle CSR.

Sono previsti tre tipi di livelli d'analisi che fanno riferimento alla procedura *Risk-Based Corrective Action* (RBCA) pubblicata dall'*American Society for Testing and Materials* (ASTM) per guidare gli interventi in siti contaminati da idrocarburi, aggiornata nel 1998 integrando la guida PS104 che riguarda più in generale il rilascio delle sostanze chimiche. La procedura RBCA prevede un approccio scalare a tre livelli, in cui all'aumentare del livello aumenta anche l'accuratezza della caratterizzazione del sito, si aumentano la mole di dati e le indagini richieste. Nella fig. 2.23 vediamo una rappresentazione grafica di quanto detto.

Nel primo livello, l'Adr fa riferimento a condizioni sito-generiche in cui le modalità di esposizione sono sia dirette che indirette, applicando questo livello si possono derivare i *Risk Based Screening Levels* (RBSL) ovvero lo screening delle concentrazioni nelle varie matrici ambientali. Importante sottolineare che la posizione del recettore coincide con il punto della contaminazione.

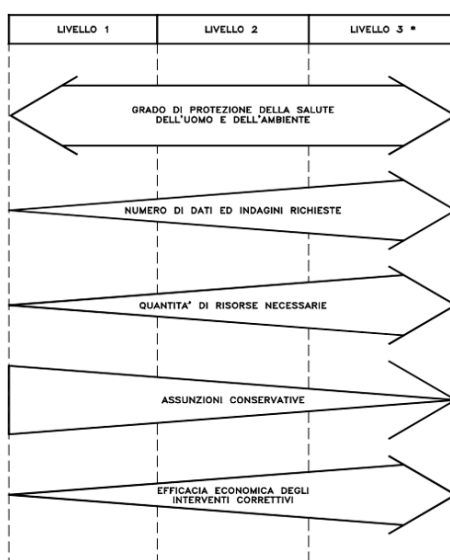


Figura 2.23: Procedura RBCA a tre livelli

Il secondo livello prevede la stima del rischio per bersagli che sono presenti sia nel punto della contaminazione che distanti da esso in un mezzo omogeneo e isotropo, necessita di un'indagine più approfondita rispetto al primo livello con la formulazione di diversi scenari. Da tale livello possiamo derivare i *Site Specific Target Levels* (SSTL) ovvero i

valori, nel suolo saturo e insaturo, che devono essere raggiunti con l'obiettivo della bonifica.

Il terzo livello utilizza dei modelli numerici e analisi probabilistiche che permettono di valutare l'eterogeneità delle matrici ambientali e di conseguenza di stimare con maggiore accuratezza la dispersione degli inquinanti.

Di seguito verrà presentata un'analisi di rischio in modalità inversa, spiegata passo-passo, prendendo come input i risultati delle analisi chimiche del punto di campionamento B1. La prima parte dell'AdR viene eseguita con il supporto del software Excel per la determinazione e la validazione dei parametri sito-specifici rappresentati dalle trentatré schede redatte dall'APAT nel 2008 in cui vengono inseriti i dati ottenuti dalle indagini geofisiche.

Per il calcolo delle CSR ci si affida al software Risk-net 3.1.1, che applica automaticamente le formule presentate precedentemente e i passaggi a computer sono riportati nell'Allegato 4.

Per quanto riguarda l'area di bonifica, inizialmente sono state selezionate le diverse sorgenti e i percorsi di esposizione on-site, successivamente sono stati selezionati i recettori e i fattori di esposizione.

Il passo successivo è quello di selezionare i tipi di contaminanti presenti nella lista fornita dal software ed inserire le concentrazioni di ciascuno riscontrati nelle analisi di laboratorio. La concentrazione dei contaminanti da inserire, se sono presenti più punti di campionamento, sarà quella più alta se i punti di campionamento dovessero essere minori di dieci, in caso contrario dovremmo utilizzare delle formule statistiche per determinare la concentrazione da inserire nel software.

Come passaggio finale si devono aggiungere i parametri chimico-fisici del sito in esame come densità del suolo, pH, gradiente idraulico e molti altri parametri che possiamo vedere nell'Allegato 4, elaborati dall'APAT nel 2008 *“Documento di riferimento per la determinazione e la validazione dei parametri sito-specifici utilizzati nell'applicazione dell'analisi di rischio ai sensi del D.Lgs 152/06”*.

Dopo aver inserito correttamente tutti i dati sito, il software ci calcolerà automaticamente le CSR che potranno essere visualizzate in una semplice tabella che verrà presentata nel prossimo paragrafo.

3.0 Risultati e discussione

I risultati ottenuti dalle analisi indipendenti sono riportati nell'Allegato 5 dove vengono visualizzati i cromatogrammi dei due bianchi, dei sei campioni e le tabelle con le aree relative ad ogni picco dei nostri analiti. Nella Tabella 1.5 sono riportate le concentrazioni ottenute dalle analisi elaborate mediante le equazioni viste nel paragrafo 2.7.

Si può							notare

immediatamente i valori elevati nel campione B1, in cui sono evidenziati gli IPA che superano le CSC viste nel paragrafo 1.2. Questo può derivare dal fatto che la bonifica è iniziata ad aprile 2026, e come già sottolineato precedentemente, una diminuzione apprezzabile delle concentrazioni degli inquinanti la possiamo osservare ad almeno sei mesi dall'inoculo dei microfunghi.

Nei cinque campioni rimanenti i valori degli IPA sono più che accettabili, in quanto non sono superate le CSC di nessun composto. Un risultato atteso in merito all'efficacia dell'intervento di biorisanamento nella zona d'interesse.

Tabella

1.5:

IPA mg/Kg	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Naftalene	0,001	0,003	0,001	0,050	<0,001	0,004
Acenaftilene	<0,001	0,001	0,001	0,002	<0,001	0,001
Acenaftene	0,001	0,002	0,001	0,041	0,001	0,004
Fluorene	0,001	0,002	0,001	0,079	0,001	0,003
Fenantrene	0,010	0,036	0,013	0,476	0,014	0,040
Antracene	0,001	0,004	0,001	0,118	0,002	0,008
Fluorantene	0,026	0,097	0,031	0,799	0,036	0,116
Pirene	0,022	0,082	0,027	0,602	0,030	0,099
Benzo[a]antracene	0,014	0,077	0,028	0,727	0,030	0,142
Crisene	0,019	0,072	0,031	0,578	0,029	0,082
Benzo[b]fluorantene	0,034	0,076	0,046	0,718	0,057	0,102
Benzo[k]fluorantene	0,007	0,019	0,010	0,204	0,015	0,024
Benzo[a]pirene	0,017	0,057	0,027	0,534	0,027	0,056
Perilene	0,016	0,014	0,026	0,094	0,002	0,006
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	0,031	0,065	0,040	0,595	0,049	0,083
Benzo[g,h,i]perilene	0,024	0,049	0,033	0,423	0,035	0,062
Dibenzo[a,h]antracene	0,005	0,015	0,010	0,176	0,011	0,020

Risultati ottenuti dalle analisi indipendenti

Per avere un'idea dell'azione dei microfunghi nella degradazione degli IPA, rapportiamo sei punti di campionamento differenti il più vicini tra di loro: tre prima dell'intervento quali M2, S2 ed PP5 e i tre eseguiti con il campionamento indipendente A2, A3 e B3.

Nelle fig. 3.1, 3.2 e 3.3 sono riportati i grafici ottenuti da Excel per sette IPA differenti.

Nella fig. 3.1 è raffigurato il rapporto tra il punto M2 eseguito nel 2023 e il punto A2. Possiamo notare un netto decremento per i composti quali: benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantrene, benzo[a]pirene, benzo[k]fluorantrene. Per gli IPA quali: indeno[1,2,3-c,d]pirene, benzo[g,h,i]perilene e dibenzo[a,h]antracene, avendo delle concentrazioni di partenza non troppo elevate, il decremento non è molto marcato ma comunque presente.

Il secondo confronto può essere eseguito tra il punto S2 eseguito nel 2008 e B3, riportato in fig.3.2. In questo caso i valori precedenti all'intervento sono più elevati rispetto a quelli visti in precedenza e il decremento delle concentrazioni di tutti i composti è maggiormente marcato.

Il terzo confronto è tra il punto PP5 eseguito nel 2006 e A3. Come nel primo caso, le concentrazioni iniziali non sono elevate ma si può osservare una netta diminuzione di tutti i sette IPA indagati.

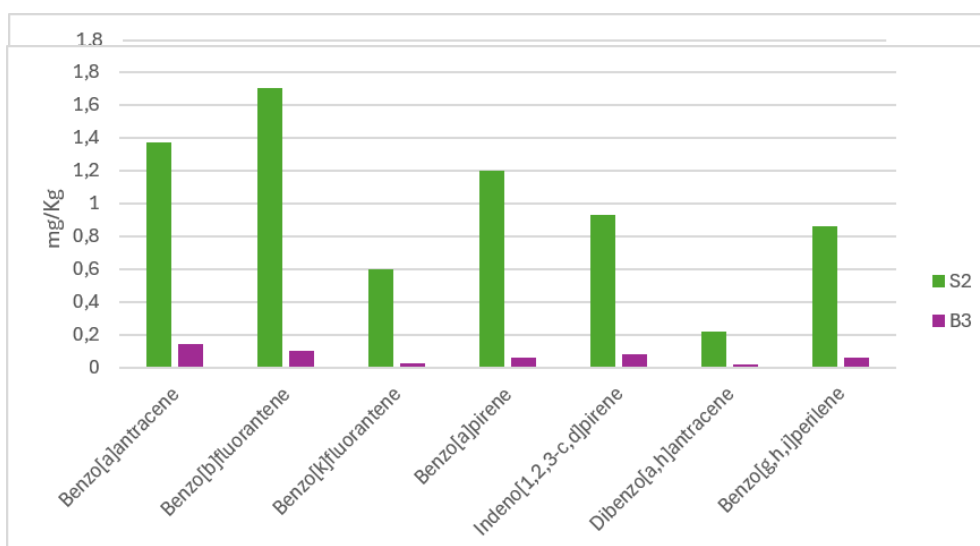


Figura 3.1: Decrementi dei composti IPA dal 2023 al

Figura 3.2: Decremento dei composti IPA dal 2008 al 2026 nei punti di campionamento S2 e B3

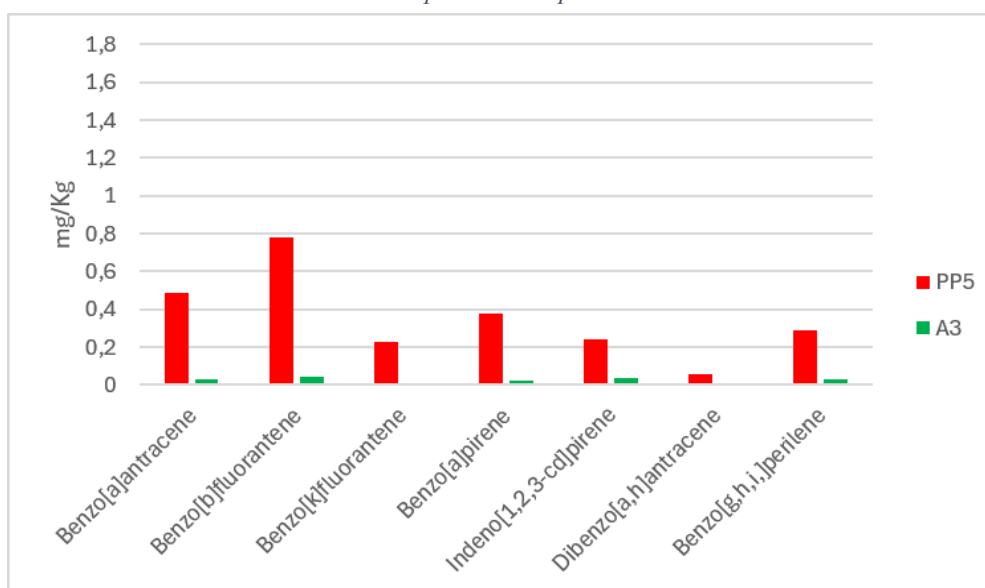


Figura 3.3: Decremento dei composti IPA dal 2006 al 2026 nei punti di campionamento PP5 e A3

L'eterogeneità del suolo gioca un ruolo fondamentale nella valutazione della contaminazione da IPA e relativa efficacia del biorisanamento. Per quanto un

campionamento possa essere rappresentativo della zona, non avremo mai la sicurezza di aver raccolto e analizzato le porzioni di suolo a maggior rischio di contaminazione. Soltanto aumentando il numero di campioni che coprono l'area di bonifica avremo una confidenza statistica tale da poter descrivere nel dettaglio lo stato del terreno.

In merito ai metaboliti indagati quali: 1-idrossipirene, 3-idrossibenzo[a]pirene e 7-idrossibenzo[a]pirene i risultati delle analisi non hanno prodotto dei dati apprezzabili, quindi, si è ritenuto necessario escluderli dalla tab. 1.5. Una possibile giustificazione per quanto accaduto è l'assenza di una procedura standardizzata per la determinazione degli IPA-OH, che ha portato ad errori nella fase di concentrazione e/o purificazione degli estratti.

Di seguito, tab. 1.6, sono riportate le CSR ottenute dell'AdR eseguita sul punto di campionamento B1 i cui parametri di input sono presenti nell'Allegato 4. È stato selezionato questo punto poiché è quello che presenta le concentrazioni più elevate di IPA. In rosso sono evidenziate le CSR che vengono superate dalle concentrazioni dei contaminanti in sorgente.

Tabella 1.6: CSR calcolate dal software Risknet per il punto B1

Concentrazioni Soglia di Rischio (CSR)

Suolo Superficiale								
CSR per il Suolo Superficiale								
Contaminante	CRS	Csat	Cres	CSC	CSR (HH)	CSR (GW)	CSR	Non conformità
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	-
Benzo(a)antracene	0.727	1.66e+1	-	5.00e-1	0.633	-	0.633	
Benzo(b)fluorantene	0.718	8.99e+0	-	5.00e-1	0.633	-	0.633	
Benzo(k)fluorantene	0.204	4.70e+0	-	5.00e-1	6.33	-	6.33	
Benzo(a)pirene	0.534	9.51e+0	-	1.00e-1	0.0633*	-	0.0633*	
Indenopirene	0.595	3.71e+0	-	1.00e-1	0.633	-	0.633	
Dibenzo(a,h)antracene	0.176	4.76e+1	-	1.00e-1	0.0633*	-	0.0633*	
Benzo(g,h,i)perilene	0.423	4.11e+0	-	1.00e-1	1720.2	-	1720.2	

I composti quali: benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantrene, benzo[a]pirene e dibenzo[a,h]antracene superano le CSR previste per il sito in esame mentre i tre composti rimanenti sono al di sotto delle soglie di rischio.

Questa AdR è stata svolta nel mezzo del processo di biorisanamento e nel punto con le concentrazioni maggiori, quindi, dovremo aspettare la conclusione della bonifica per eseguire un'analisi di rischio che possa essere al di sotto delle CSR.

Per il monitoraggio a lungo termine, Veritas Spa e Desam sono incaricate dal Comune di Venezia di sorvegliare il corretto svolgimento della *mycoremediation* mediante campionamenti prestabiliti per tutto il periodo necessario alla degradazione degli IPA che sarà di circa due anni.

4.0 Conclusione

L'efficacia della tecnica di biorisanamento presentata nei paragrafi precedenti deve essere contestualizzata al sito preso in esame.

La procedura di bonifica è stata eseguita su un terreno che presentava concentrazioni leggermente sopra alle CSR, quindi, non per terreni altamente contaminati con ordini di grandezza di dieci o addirittura cento volte più elevati del normale. Per tali condizioni, ritengo opportuno adottare una messa in sicurezza urgente e adoperare i classici interventi di bonifica (scavo e imbonimento).

Nelle condizioni delle Ex Cave Casarin in cui non vi sono presenti alte concentrazioni di IPA, è stato molto interessante adottare questo tipo di approccio innovativo per il recupero del suolo, poiché, le risorse necessarie per completare la *mycoremediation* sono nettamente minori rispetto a quelle normalmente adottate.

Non si può escludere in futuro un potenziamento di questa tecnica, tramite, per esempio, l'introduzione di una miscela di gas per favorire l'accrescimento dei microfunghi con una conseguente produzione maggiore di enzimi per la degradazione degli inquinanti.

Questo lavoro di tesi è stato eseguito per avere una visione a trecentosessanta gradi per quanto riguarda le bonifiche ambientali, tema molto interessante e fondamentale per il futuro sviluppo dell'uomo su questo pianeta.

5.0 Ringraziamenti

Ringrazio l'interno ufficio di Veritas Spa Smaltimenti. Grazie a Giorgio, Anna, Francesco e Sara per avermi accolto nei sei mesi di tirocinio, dove ho imparato l'approccio pratico nella bonifica ambientale.

Ringrazio la professoressa Cristina per essere stata sempre disponibile e gentile nella stesura della tesi e la ricercatrice Elena per avermi guidato sapientemente nelle analisi in laboratorio.

Ringrazio i miei genitori e tutta la mia famiglia per la pazienza data in questi anni universitari.

Infine, grazie Giorgia per avermi fatto scoprire me stesso e ciò che voglio diventare nel nostro bellissimo futuro.

6.0 Bibliografia e sitografia

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://www.isprambiente.gov.it/files/temi/siti-contaminati-02marzo08.pdf>

<https://bur.regione.veneto.it/BurVServices/pubblica/DettaglioDgr.aspx?id=53655>

A Cox, P. W, A Paul, G. C., A Thomas, C. R., Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms, (1998), J Microbiology. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-817>

Agrawal, K., Chaturvedi, V. & Verma, P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. Bioresour. Bioprocess. (2018), <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z> Published 31 January 2018

Ayodeji O. Falade, Uchechukwu U. Nwodo^{1,2} | Benson C. Iweriebor, Ezekiel Green, Leonard V. Mabinya, Anthony I. Okok: Lignin peroxidase functionalities and prospective applications (2017), <https://doi.org/10.1002/mbo3.394>. Feng Y, Li Z, Li W. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Environmental Persistence and Human Health Risks. Natural Product Communications. (2025), <https://doi.org/10.1177/1934578X241311451>

A. Mohammednoor and A. Labeeb. Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Thermal Systems: A Comprehensive Mechanistic Review, (2024), <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.4c03513>

Al Farraj, D.A., Hadibarata, T., Elshikh, M.S. et al. Biotransformation and Degradation Pathway of Pyrene by Filamentous Soil Fungus *Trichoderma* sp. F03. Water Air Soil Pollut (2020). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04514-0>

D.E. Pitt, A.T. Bull, Use of autoradiography to quantify aspects of fungal growth and starvation in submerged liquid culture, Transactions of the British Mycological Society, (1982). [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(82\)80081-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(82)80081-8)

Ewa, B., Danuta, MŠ. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. J Appl Genetics (2017), <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>

Ferreira Azevedo, L., de Souza Rocha, C.C., Souza, M.C.O. et al. High molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon (HMW-PAH) isomers: unveiling distinct toxic effects from cytotoxicity to oxidative stress-induced DNA damage. Arch Toxicol, (2025), <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03917-w>

Godoy, P., Reina, R., Calderón, A. et al. Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. Environ Sci Pollut Res 23, (2016), <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7257-1>

Kulikova, N.A., Klein, O.I., Stepanova, E.V. et al. Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: Fundamental and applied aspects (review). Appl Biochem Microbiol, (2011), <https://doi.org/10.1134/S000368381106007X>

Martin Hofrichter, Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), Enzyme and Microbial Technology, (2002), [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2).

Nahid Akhtar, M. Amin-ul Mannan, Mycoremediation: Expunging environmental pollutants, Biotechnology Reports, (2020), <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>.

Rani, M.H.S., Nandana, R.K., Khatun, A. et al. Three strategy rules of filamentous fungi in hydrocarbon remediation: an overview. Biodegradation (2024), <https://doi.org/10.1007/s10532-024-10086-1>

Riry Wirasnita, Tony Hadibarata, Potential of the White-Rot Fungus *Pleurotus pulmonarius* F043 for Degradation and Transformation of Fluoranthene, (2016), [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60021-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60021-2)

Sili Chen, Liqin Xiong, Xinlan Wu, Lu Chen, Junwei Zhang, Guanqing Jiang, Xin Li, Qiaoyuan Yang, Molecular mechanisms by which benzo[ghi]perylene promotes cell proliferation and DNA damage via downregulation of the chimeric RNA TVP23C-CDRT4/miR-24-3p axis, Toxicology (2025), <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2025.111755>.

Sreenivasulu Dasari, Muni Swamy Ganjayi, Prabhakar Yellanurkonda, Sreenivasulu Basha, Balaji Meriga, Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene, Chemico-Biological Interactions, (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>.

Yadav, P., Rai, S.N., Mishra, V. et al. Mycoremediation of environmental pollutants: a review with special emphasis on mushrooms. Environmental Sustainability, (2021), <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00197-3>

Zang, Shuyan, et al. Degradation mechanisms of benzo [a] pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. Chemosphere, (2007), <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.034>

Allegato 1

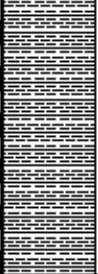
Interventi nella Regione Veneto sovvenzionati dal PNRR

Soggetto attuatore esterno	Sito orfano	Intervento	Costo complessivo
Spinea VE	Ex discarica di via Luneo - stralcio conclusivo	Messa in Sicurezza Permanente di una ex discarica- stralcio conclusivo	€ 4.469.166,01
	(intervento che ricade nel Bacino scolante nella Laguna di Venezia)		
Cavallino Treporti VE	Area Ex stazione di travaso del Cavallino	Progettazione e bonifica dei suoli e rimozione/contenimento della fonte primaria di contaminazione	€ 4.303.300,00
	(intervento che ricade nel Bacino scolante nella Laguna di Venezia)		
S. Martino di Lupari PD	Ex impianto distributore carburanti via La Marmora	Progettazione ed esecuzione bonifica	€ 703.300,00
	(intervento che ricade nel Bacino scolante nella Laguna di Venezia)		
Venezia	Ex Cave Casarin - stralcio 3 lotto 2 conclusivo	Esecuzione dell'intervento di bonifica dei suoli	€ 2.503.300,00
	(intervento che ricade nel Bacino scolante nella Laguna di Venezia)		
Isola Rizza VR	Area Ex Cava Bastiello	Completamento delle attività di bonifica del sito	€ 7.544.000,00
Venezia	Isola dell'ex inceneritore di Sacca Fisola	Progettazione ed esecuzione dell'intervento di bonifica	€ 2.503.300,00
	(intervento che ricade nel Bacino scolante nella Laguna di Venezia)		
Portogruaro VE	Area ex Perfosfati	Bonifica /MISP del sito	€ 853.300,00
Venezia	Area Forte Marghera – Mestre	Progettazione ed esecuzione bonifica terreni	€ 4.803.300,00
	(intervento che ricade nel Bacino scolante nella Laguna di Venezia)		
Adria RO	SOCEIC	Progettazione e conclusione della MISP del sito di una ex discarica 2B	€ 3.503.300,00
Sarego VI	Terreni Sarego intermedio	Caratterizzazione integrativa, progettazione e realizzazione bonifica ed eventuale ADR	€ 177.200,00
Totale interventi ricadenti nel territorio del Bacino Scolante nella Laguna di Venezia			€ 19.285.666,01
Totale interventi NON ricadenti nel territorio del Bacino Scolante nella Laguna di Venezia			€ 12.077.800,00
TOTALE			€ 31.363.466,01

Allegato 2

Indagini geofisiche

Committente: VERITAS S.P.A.	Sondaggio: T9
Riferimento: Area Ex cave Casarin - Venezia	Data: 06/08/2020
Attrezzatura: Sonda idraulica, Beretta T45	Quota:
Perforazione: Carotaggio continuo	

SCALA 1:25			STRATIGRAFIA - T9				Pagina 1/1			
o m	R A	metri m	LITOLOGIA	prof. m	DESCRIZIONE	Campioni	Prof. m	POZZO	L.R. m	L.P. m
101		1		1.2	Limo debolmente argilloso marrone-nocciola.	C1) Amb < 0,10 0,80				
					C2) Amb < 0,80 1,20					
					FINE SONDAGGIO					
		2								
		3								
		4								
		5		5.0						



AGROLAB Italia S.r.l. a socio unico

Via Retrone 29/31
36077 Altavilla Vicentina VI - Italy
Tel.: +39 0444 349040 Fax: +39 0444 349041
altavilla@agrolab.it www.agrolab.it



Numero cliente:

VERITAS SPA
Santa Croce, 489
30135 VENEZIA (VE)

Rapporto di prova

Data: 06.05.2026

Ordine 451922
Numero di campione 467942 Terreno
Descrizione del campione fornita dal cliente T9 Subarea A (0,00-0,50 mt) T0
Arrivo del campione 22.04.2026
Data di campionamento 21.04.2026
Campionatore Cliente (Non comunicato)¹⁾
Ritirato da Tecnico Agrolab Italia:
Luogo di ritiro Mestre
Data e ora del ritiro 22.04.2026 13:20

Parametri Fisici, Chimici e Chimico-Fisici

Parametro	Unità di misura	Valore su SS ¹⁾	Incertezza	LOQ	Inizio - fine analisi	Metodo
Capacità di scambio cationico ¹⁾	meq/100g	20,4	+/- 6,1	1	22.04.2026 - 29.04.2026	DM 13/09/1999 SO n° 185 GU n° 248 21/10/1999 Met XIII.2 + DM 25/03/2002 GU n° 84 10/04/2002
Residuo a 105 °C	%	78,8 ¹⁾	+/- 7,1	0,1	22.04.2026 - 24.04.2026	CNR IRSA 2 Q 64 Vol 2 1984 Notiziario 2 2008
pH (in H ₂ O) ¹⁾	upH	7,98		1	22.04.2026 - 27.04.2026	DM 13/09/1999 SO n° 185 GU n° 248 21/10/1999 Met III.1
Scheletro (2 mm - 2 cm)	g/kg	<1,00 ¹⁾		1	22.04.2026 - 24.04.2026	DM 13/09/1999 SO n° 185 GU n° 248 21/10/1999 Met II.1

Parametro	Unità di misura	Valore su SS ¹⁾	Incertezza	LOQ	Inizio - fine analisi	Metodo
Conducibilità ¹⁾	µS/cm	90,0		1	22.04.2026 - 28.04.2026	DM 13/09/1999 SO n° 185 GU n° 248 21/10/1999 Met IV.1

Costituenti Organici - Saggi

Parametro	Unità di misura	Valore su SS ¹⁾	Incertezza	LOQ	Inizio - fine analisi	Metodo
Carbonio organico totale (TOC)	%	2,06	+/- 0,62	0,1	22.04.2026 - 28.04.2026	DM 13/09/1999 SO n° 185 GU n° 248 21/10/1999 Met VII.3

Granulometria

Parametro	Unità di misura	Valore su SS ¹⁾	Incertezza	LOQ	Inizio - fine analisi	Metodo
Ghiaia (da calcolo) ¹⁾	%	<0,1 ¹⁾		0,1	22.04.2026 - 24.04.2026	DM 13/09/1999 SO n° 185 GU n° 248 21/10/1999 Met II.1

Le prove riportate in questo documento sono accreditate secondo la UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. Le attività non accreditate da ACCREDIA sono contrassegnate con il simbolo ¹⁾.

DOC-06-054030527-01

C.F. e P.IVA 03378780245
cap. soc. € 150.000,00 i.v.
reg. imp. di VI/03378780245
Direzione e Coordinamento
AGROLAB GmbH



pagina 1 di 3

00131

Allegato 3

Risultati delle analisi condotte dal 2006 al 2023

	2006-2008		2018	2020	2022			2023	
Composto IPA mg/Kg	PP5	S2	D	T9	R5	R6	R7	M1	M2
Benzo[a]antracene	0,49	1,37	0,08	0,1	0,12	0,187	0,101	0,19	0,51
Benzo[b]fluorantene	0,78	1,7	0,14	0,15	0,161	0,199	0,12	0,31	0,67
Benzo[k]fluorantene	0,23	0,6	0,06	0,08	0,068	0,088	0,055	0,12	0,19
Benzo[a]pirene	0,38	1,2	0,1	0,12	0,115	0,17	0,112	0,26	0,37
Indeno[1,2,3-cd]pirene	0,24	0,93	0,06	0,07	-	-	-	0,15	0,14
Dibenzo[a,h]antracene	0,06	0,22	0,02	0,02	-	-	-	0,04	0,04
Benzo[g,h,i]perilene	0,29	0,86	0,08	0,11	0,054	0,076	0,048	0,19	0,15
Dibenzo[a,l]pirene	0,1	0,37	-	-	-	-	-	<0,0100	<0,0100
Dibenzo[a,e]pirene	0,07	0,18	-	-	-	-	-	0,03	0,05
Dibenzo[a,i]pirene	-	0,17	-	-	-	-	-	0,02	0,04
Dibenzo[a,h]pirene	-	-	-	-	-	-	-	<0,0100	<0,0100
Crisene	-	-	-	-	-	-	-	0,29	1,00
Pirene	-	-	-	-	-	-	-	0,27	1,38
Naftalene	-	-	-	-	-	-	-	<0,10	0,38
Acenaftene	-	-	-	-	-	-	-	<0,10	<0,10
Fluorene	-	-	-	-	-	-	-	<0,10	<0,10
Fluorantene	-	-	-	-	-	-	-	0,33	1,80
Fenantrene	-	-	-	-	-	-	-	0,18	0,45
Acenaftilene	-	-	-	-	-	-	-	<0,10	<0,10
Antracene	-	-	-	-	-	-	-	<0,10	<0,10

Allegato 4

Interfaccia utente del software Risk-net

Modello Concettuale del Sito

Caratterizzazione standard Caratterizzazione integrativa Caratterizzazione prodotti alimentari

Modello Concettuale del Sito Seleziona Tutti Deseleziona Tutti Default Help

Sorgente	Percorso di esposizione	On-Site	Off-Site
Suolo Superficiale	Contatto diretto	☒ Ingestione di suolo e contatto dermico	☒ On-Site No Off-site
	Volatilizzazione Erosione Vento	☒ Inalazione Vapori Outdoor	☒ On-Site ☐ Off-Site
		☐ Inalazione Vapori Indoor	☐ On-Site No Off-site
		☒ Inalazione Polveri Outdoor	☒ On-Site ☐ Off-Site
		☐ Inalazione Polveri Indoor	☐ On-Site No Off-site
	Dilavamento	☐ Lisciviazione in Falda	☐ POC = 0 m ☐ POC > 0 m
	Suolo Profondo	Volatilizzazione	☐ Inalazione Vapori Outdoor ☐ On-Site ☐ Off-Site
		☐ Inalazione Vapori Indoor ☐ On-Site No Off-site	
Dilavamento		☐ Lisciviazione in Falda ☐ POC = 0 m ☐ POC > 0 m	
Falda	Volatilizzazione	☐ Inalazione Vapori Outdoor ☐ On-Site ☐ Off-Site	
		☐ Inalazione Vapori Indoor ☐ On-Site ☐ Off-Site	
	Diretto	☐ Protezione risorsa idrica ☐ POC = 0 m ☐ POC > 0 m	

Recettori

on-site

Recettori on-site Help

Residenziale / Ricreativo	☐ Adulti e Bambini (Adjusted) ☒ Adulti, Bambini, Adolescenti e Anziani ☒ Per sostanze tossiche considera recettore più critico
Industriale / Commerciale	☐ Adulti ☐ Bambini
	☐ Lavoratori

Parametri del sito

Geometria Sorgenti		Zona Insatura				
Zona Insatura				★ Default	Copia tabella	Help
Descrizione		Valore				
Parametro	Simbolo	Default	Sito-Specifico	UM	check	
Tessitura della Zona Insatura						
Selezione la tessitura rappresentativa del suolo insaturo			Loamy Sand ▼			
Porosità efficace del terreno in zona insatura	θ_e	Letteratura	0.353	-	✓	
Contenuto volumetrico di acqua nel suolo	θ_w	Letteratura	0.103	-	✓	
Contenuto volumetrico di aria nel suolo	θ_a	Letteratura	0.25	-	✓	
Contenuto volumetrico di acqua nella frangia capillare	$\theta_{w,cap}$	Letteratura	0.318	-	✓	
Contenuto volumetrico di aria nella frangia capillare	$\theta_{a,cap}$	Letteratura	0.035	-	✓	
Spessore della frangia capillare	h_{cap}	Letteratura	0.188	m	✓	
Carico idraulico critico (potenziale di matrice)	h_{cr}	Letteratura	-0.0486	m	✓	
Conducibilità idraulica del terreno nella zona insatura	$K_{sat,s}$	Letteratura	4.05e-5	m/s	✓	
Battente idrico in superficie	H_w	0.25		m	✓	
Caratteristiche della Zona Insatura						
Densità del suolo	ρ_s	1.7	1.7	g/cm ³	✓	
pH del suolo	pH	6.8	6.8	-	✓	
Frazione di carbonio organico - suolo superficiale	$f_{oc,SS}$	0.01	0.01	g/g	✓	
Frazione di carbonio organico - suolo profondo	$f_{oc,SP}$	0.01	0.01	g/g	✓	
Frazione residua dei pori nel suolo (per calcolo Cres)	S_r	0.04	0.04	m	✓	
Spessore della zona insatura	h_v	Calcolato	2.812	m	✓	
Infiltrazione nel sottosuolo						
Calcola l'infiltrazione efficace nel suolo			☒ Calcolato			
Pioggia media annua	P	129	129	cm/y	✓	
Frazione areale di fratture outdoor	η_{out}	1	1	-	✓	
Infiltrazione efficace nel suolo	i_{ef}	Calcolato	29.95	cm/y	✓	

Fattori di esposizione

on-site							
Fattori di esposizione		★ Default	Copia tabella	Help			
Esposizione		On Site					
Ambito		Residenziale				Industriale	
Parametri di esposizione	Simbolo	UM	Bambini	Adolescenti	Adulti	Anziani	Lavoratore
Fattori Comuni							
Peso Corporeo	BW	kg	15	15	70	70	70
Tempo di mediazione cancerogeni	AT	y	70				
Durata di esposizione	ED	y	6	10	24	5	25
Frequenza di esposizione	EF	d/y	350	350	350	350	250
Ingestione di suolo							
Frazione di suolo ingerita	FI	-	1	1	1	1	1
Tasso di ingestione suolo	IR	mg/d	200	200	100	100	50
Contatto Dermico							
Superficie di pelle esposta	SA	cm ²	2800	2800	5700	5700	3300
Fattore di aderenza dermica	AF	mg/cm ² /d	0.2	0.2	0.07	0.07	0.2
Inalazione di vapori e polveri outdoor							
Frequenza giornaliera outdoor (c)	EFgo	h/d	24	0.5	24	1.9	8
Tasso di inalazione di vapori e polveri outdoor (a),(b)	Bo	m ³ /h	0.7	0.7	0.9	0.9	2.5
Frazione di suolo nella polvere outdoor	Fsd	-	1	1	1	1	1
Inalazione di vapori e polveri indoor							
Frequenza Giornaliera Indoor	EFgi	h/d	24	19.6	24	22.4	8
Tasso di inalazione di vapori e polveri indoor (b)	Bi	m ³ /h	0.7	0.7	0.9	0.9	0.9
Frazione di suolo nella polvere indoor	Fi	-	1	1	1	1	1
Ingestione di acqua							
Tasso di ingestione di acqua	IRw	L/d	1	1	2	2	1

Concentrazioni Rappresentative della Sorgente

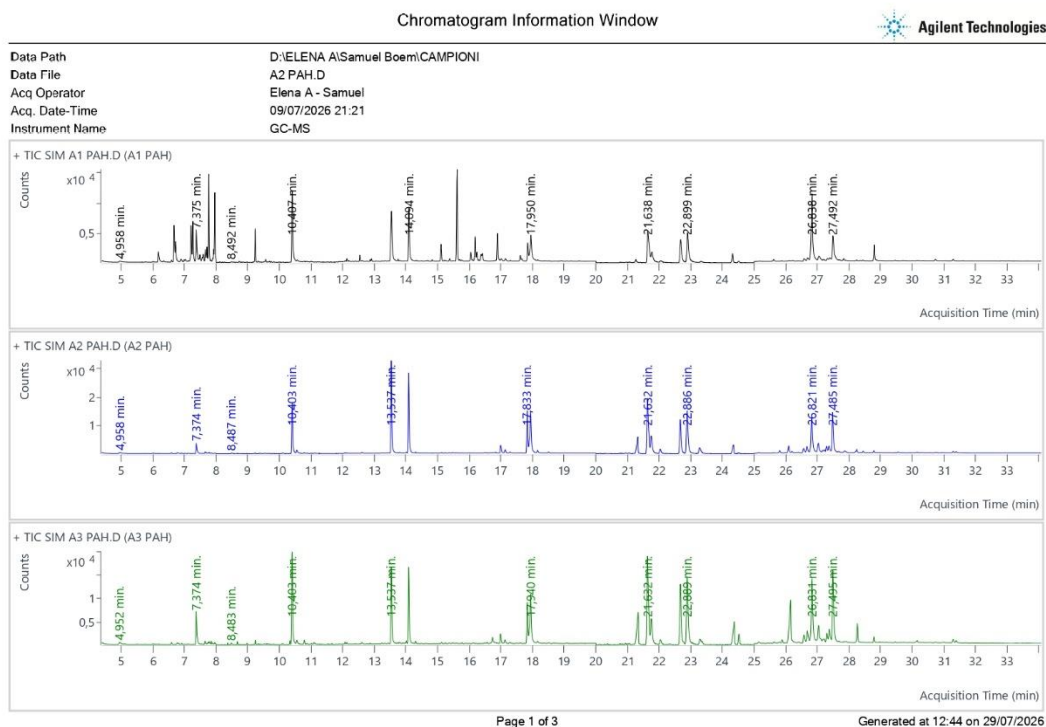
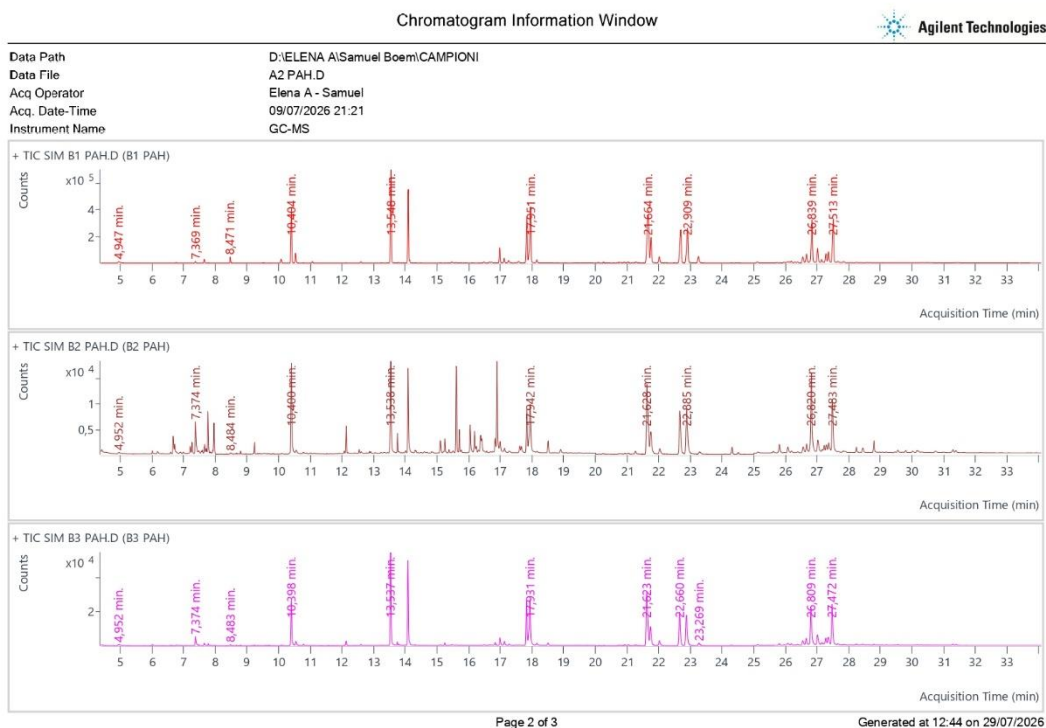
Suolo e Falda	
Suolo e Falda	
Contaminante	Suolo Superficiale
	Concentrazione nel terreno
	(mg/kg)
Benzo(a)antracene	0.727
Benzo(b)fluorantene	0.718
Benzo(k)fluorantene	0.204
Benzo(a)pirene	0.534
Indenopirene	0.595
Dibenzo(a,h)antracene	0.176
Benzo(g,h,i)perilene	0.423

Parametri chimico-fisici del sito

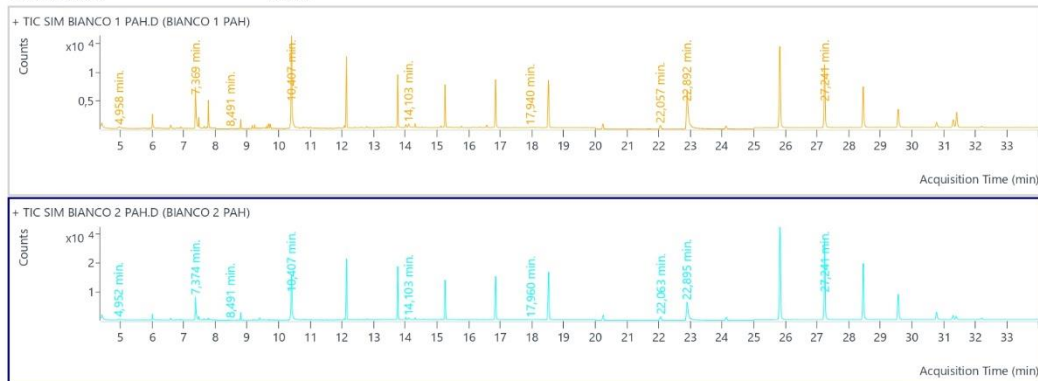
n.	SIMBOLO	PARAMETRO	UNITA' DI MISURA
SUOLO INSATURO			
1	L_{GW}	Profondità del piano di falda	cm
2	h_v	Spessore della zona insatura	cm
3	W'	Estensione della sorgente di contaminazione nella direzione principale del vento	cm
4	S_w'	Estensione della sorgente di contaminazione nella direzione ortogonale a quella principale del vento	cm
5	A'	Area della sorgente (rispetto alla direzione prevalente del vento)	cm ²
6	$L_{s(SS)}$	Profondità del top della sorgente nel suolo superficiale rispetto al p.c.	cm
7	$L_{s(SP)}$	Profondità del top della sorgente nel suolo profondo rispetto al p.c.	cm
8	L_f	Profondità della base della sorgente rispetto al p.c.	cm
9	d_s	Spessore della sorgente nel suolo profondo (insaturo)	cm
10	d	Spessore della sorgente nel suolo superficiale (insaturo)	cm
11	L_F	Soggiacenza della falda rispetto al top della sorgente	cm
12	ρ_s	Densità del suolo	g/cm ³
13	I_{ef}	Infiltrazione efficace	cm/anno
14	f_{oc}	Frazione di carbonio organico nel suolo insaturo	g-C/g-suolo
15	pH	pH del suolo insaturo	adim.
SUOLO SATURO			
16	d_a	Spessore della falda	cm
17	W	Estensione della sorgente nella direzione del flusso di falda	cm
18	S_w	Estensione della sorgente nella direzione ortogonale al flusso di falda	cm
19	A	Area della sorgente (rispetto alla direzione del flusso di falda)	cm ²
20	W'	Estensione della sorgente di contaminazione nella direzione principale del vento	cm
21	S_w'	Estensione della sorgente di contaminazione nella direzione ortogonale a quella principale del vento	cm
22	A'	Area della sorgente (rispetto alla direzione prevalente del vento)	cm ²
23	v_{gw}	Velocità di Darcy	cm/anno
24	K_{sat}	Conducibilità idraulica del terreno saturo	cm/anno
25	i	Gradiente idraulico	adim.
26	f_{oc}	Frazione di carbonio organico nel suolo saturo	g-C/g-suolo
27	pH	pH del suolo saturo	adim.
AMBIENTI APERTI/CONFINATI			
28	U_{air}	Velocità del vento	cm/s
29	A_b	Superficie totale coinvolta nell'infiltrazione	cm ²
30	L_{crack}	Spessore delle fondazioni/muri	cm
31	L_b	Rapporto tra volume indoor ed area di infiltrazione (RES. O IND.)	cm
32	L_T	Distanza tra il top della sorgente nel suolo insaturo (in falda) e la base delle fondazioni	cm
33	Z_{crack}	Profondità delle fondazioni	cm

Allegato 5

Cromatogrammi ottenuti dalle analisi indipendenti



Data Path D:\ELENA A\Samuel Boemi\CAMPIONI
 Data File A2 PAH.D
 Acq. Operator Elena A - Samuel
 Acq. Date-Time 09/07/2026 21:21
 Instrument Name GC-MS



Quantità assoluta di analita nel BIANCO 1

PAH	Area	Average RF	IS Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	1640,36	1,25		4,32
Acenaphthylene	244,181	1,23		0,66
Acenaphthene	253,085	0,82		1,02
Acenaphthylene ¹³ C	15128,2	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	195,447	0,97		0,66
Phenanthrene	2362,64	0,93		3,81
Anthracene	131,456	0,70		0,28
Phenanthrene ¹³ C	33342,8	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	617,202	0,97		0,95
Pyrene	2010,65	1,77		1,71
Benzo(a)Anthracene	412,223	0,63		0,98
Chrysene	412,223	1,09		0,57
Benzo(b)Fluoranthene	1696,93	1,30		2,24
Benzo(k)Fluoranthene	1696,93	1,54		1,89
Benzo(a)Pyrene	1425,36	0,96		2,55
Perylene	1425,36	1,01		2,44
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	29012,3	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	30,6641	0,89		0,06
Benzo(ghi)Perylene	40,4982	1,28		0,05
Dibenzo(A,H)Anthracene	355,972	0,91		0,68

Quantità assoluta analita nel BIANCO 2

PAH	Area	Average RFS	Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	1492,563	1,25		3,65
Acenaphthylene	260,541	1,23		0,65
Acenaphthene	302,251	0,82		1,13
Acenaphthylene ¹³ C	16305,5	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	225,7037	0,97		0,71
Phenanthrene	1944,572	0,93		3,02
Anthracene	1944,572	0,70		4,01
Phenanthrene ¹³ C	34581,19	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	225,7037	0,97		0,33
Pyrene	1922,991	1,77		1,57
Benzo(a)Anthracene	337,9823	0,63		0,77
Chrysene	337,9823	1,09		0,45
Benzo(b)Fluoranthene	3708,144	1,30		5,11
Benzo(k)Fluoranthene	3708,144	1,54		4,31
Benzo(a)Pyrene	1344,987	0,96		2,51
Perylene	1344,987	1,01		2,40
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	27845,92	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	31,58801	0,89		0,06
Benzo(ghi)Perylene	20,02262	1,28		0,03
Dibenzo(A,H)Anthracene	810,6067	0,91		1,60

Quantità assoluta di analita nel campione A1

PAH	Area	Average RFS	Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	1247,446	1,25		5,44
Acenaphthylene	303,8956	1,23		1,35
Acenaphthene	319,7698	0,82		2,14
Acenaphthylene ¹³ C	9144,7	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	314,3613	0,97		1,77
Phenanthrene	8415,171	0,93		23,26
Anthracene	976,0672	0,70		3,58
Phenanthrene ¹³ C	19444,55	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	20736	0,97		54,72
Pyrene	18960,34	1,77		27,57
Benzo(a)Anthracene	7329,674	0,63		29,75
Chrysene	16975,47	1,09		40,09
Benzo(b)Fluoranthene	21892,44	1,30		72,96
Benzo(k)Fluoranthene	6163,564	1,54		17,35
Benzo(a)Pyrene	8197,022	0,96		36,97
Perylene	8197,022	1,01		35,34
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	11503,35	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	13127,56	0,89		64,39
Benzo(ghi)Perylene	14543,46	1,28		49,28
Dibenzo(A,H)Anthracene	2550,063	0,91		12,21

Quantità assoluta di analita nel campione A2

PAH	Area	Average RFS	S Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	2087,268	1,25		10,71
Acenaphthylene	512,5612	1,23		2,68
Acenaphthene	525,9217	0,82		4,14
Acenaphthylene ¹³ C	7771,262	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	650,7868	0,97		4,31
Phenanthrene	22911,27	0,93		76,08
Anthracene	2386,062	0,70		10,53
Phenanthrene ¹³ C	16182,83	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	61973,07	0,97		196,49
Pyrene	56291,67	1,77		98,37
Benzo(a)Anthracene	32167,46	0,63		156,89
Chrysene	51235,13	1,09		145,38
Benzo(b)Fluoranthene	69705,6	1,30		157,24
Benzo(k)Fluoranthene	21835,51	1,54		41,60
Benzo(a)Pyrene	38576,89	0,96		117,77
Perylene	10361,45	1,01		30,24
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	16995,35	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	39381,3	0,89		130,75
Benzo(ghi)Perylene	43138,1	1,28		98,93
Dibenzo(A,H)Anthracene	9775,35	0,91		31,69

Quantità assoluta di analita nel campione A3

PAH	Area	Average RFS	S Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	2224,44	1,25		6,09
Acenaphthylene	655,2521	1,23		1,83
Acenaphthene	868,7137	0,82		3,64
Acenaphthylene ¹³ C	14567,68	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	890,9691	0,97		3,14
Phenanthrene	14876,29	0,93		29,70
Anthracene	1913,113	0,70		5,07
Phenanthrene ¹³ C	26915,55	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	33882,14	0,97		64,59
Pyrene	32540,47	1,77		34,19
Benzo(a)Anthracene	19535,55	0,63		57,29
Chrysene	37383,48	1,09		63,78
Benzo(b)Fluoranthene	67553,53	1,30		97,93
Benzo(k)Fluoranthene	19296,5	1,54		23,63
Benzo(a)Pyrene	29464,74	0,96		57,81
Perylene	29464,74	1,01		55,27
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	26444,09	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	38774,25	0,89		82,74
Benzo(ghi)Perylene	46279,51	1,28		68,21
Dibenzo(A,H)Anthracene	10561,96	0,91		22,00

Quantità assoluta di analita nel campione B1

PAH	Area	Average RFS	S Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	58984,51	1,25		103,26
Acenaphthylene	2471,218	1,23		4,41
Acenaphthene	31005,65	0,82		83,21
Acenaphthylene ¹³ C	22771,59	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	70219,18	0,97		158,55
Phenanthrene	772974,6	0,93		956,17
Anthracene	145510,1	0,70		239,09
Phenanthrene ¹³ C	43442,99	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	1356357	0,97		1601,92
Pyrene	1082955	1,77		704,93
Benzo(a)Anthracene	801628,6	0,63		1456,44
Chrysene	1095293	1,09		1157,73
Benzo(b)Fluoranthene	1477461	1,30		1442,22
Benzo(k)Fluoranthene	500510,5	1,54		412,62
Benzo(a)Pyrene	811642,5	0,96		1072,28
Perylene	151494,7	1,01		191,33
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	39273,29	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	829257	0,89		1191,46
Benzo(ghi)Perylene	853816,4	1,28		847,39
Dibenzo(A,H)Anthracene	252456,2	0,91		354,12

Quantità assoluta di analita nel campione B2

PAH	Area	Average RFS	S Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	1514,899	1,25		4,68
Acenaphthylene	455,5997	1,23		1,43
Acenaphthene	512,0483	0,82		2,42
Acenaphthylene ¹³ C	12911,97	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	696,9969	0,97		2,78
Phenanthrene	14644,45	0,93		33,08
Anthracene	1845,016	0,70		5,54
Phenanthrene ¹³ C	23789,22	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	35681,31	0,97		76,96
Pyrene	32348,43	1,77		38,45
Benzo(a)Anthracene	19167,46	0,63		63,59
Chrysene	31514,98	1,09		60,83
Benzo(b)Fluoranthene	50292,1	1,30		121,94
Benzo(k)Fluoranthene	16449,91	1,54		33,68
Benzo(a)Pyrene	18070,48	0,96		59,30
Perylene	2060,128	1,01		6,46
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	15811,76	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	28853,94	0,89		102,97
Benzo(ghi)Perylene	29717,9	1,28		73,26
Dibenzo(A,H)Anthracene	7183,325	0,91		25,03

Quantità assoluta di analita nel campione B3

PAH	Area	Average RFS	Abs Q (ng)	Abs Q (ng)
Naphthalene	3443,876	1,25		12,97
Acenaphthylene	921,8977	1,23		3,54
Acenaphthene	1799,919	0,82		10,40
Acenaphthylene ¹³ C	10581,03	#RIF!	50	#RIF!
Fluorene	1681,857	0,97		8,17
Phenanthrene	34974,22	0,93		96,71
Anthracene	5661,667	0,70		20,79
Phenanthrene ¹³ C	19434,95	#RIF!	50	#RIF!
Fluoranthene	102866,9	0,97		271,57
Pyrene	94018,19	1,77		136,80
Benzo(a)Anthracene	81833,86	0,63		332,34
Chrysene	81513,6	1,09		192,60
Benzo(b)Fluoranthene	113988,9	1,30		241,95
Benzo(k)Fluoranthene	32650,23	1,54		58,53
Benzo(a)Pyrene	46258,06	0,96		132,88
Perylene	5856,715	1,01		16,08
Benzo(a)Pyrene ¹³ C	18061,43	#RIF!	50	#RIF!
Indeno(1,2,3-c,d)Pyrene	61998,72	0,89		193,70
Benzo(ghi)Perylene	66649,4	1,28		143,83
Dibenzo(A,H)Anthracene	15813,52	0,91		48,23