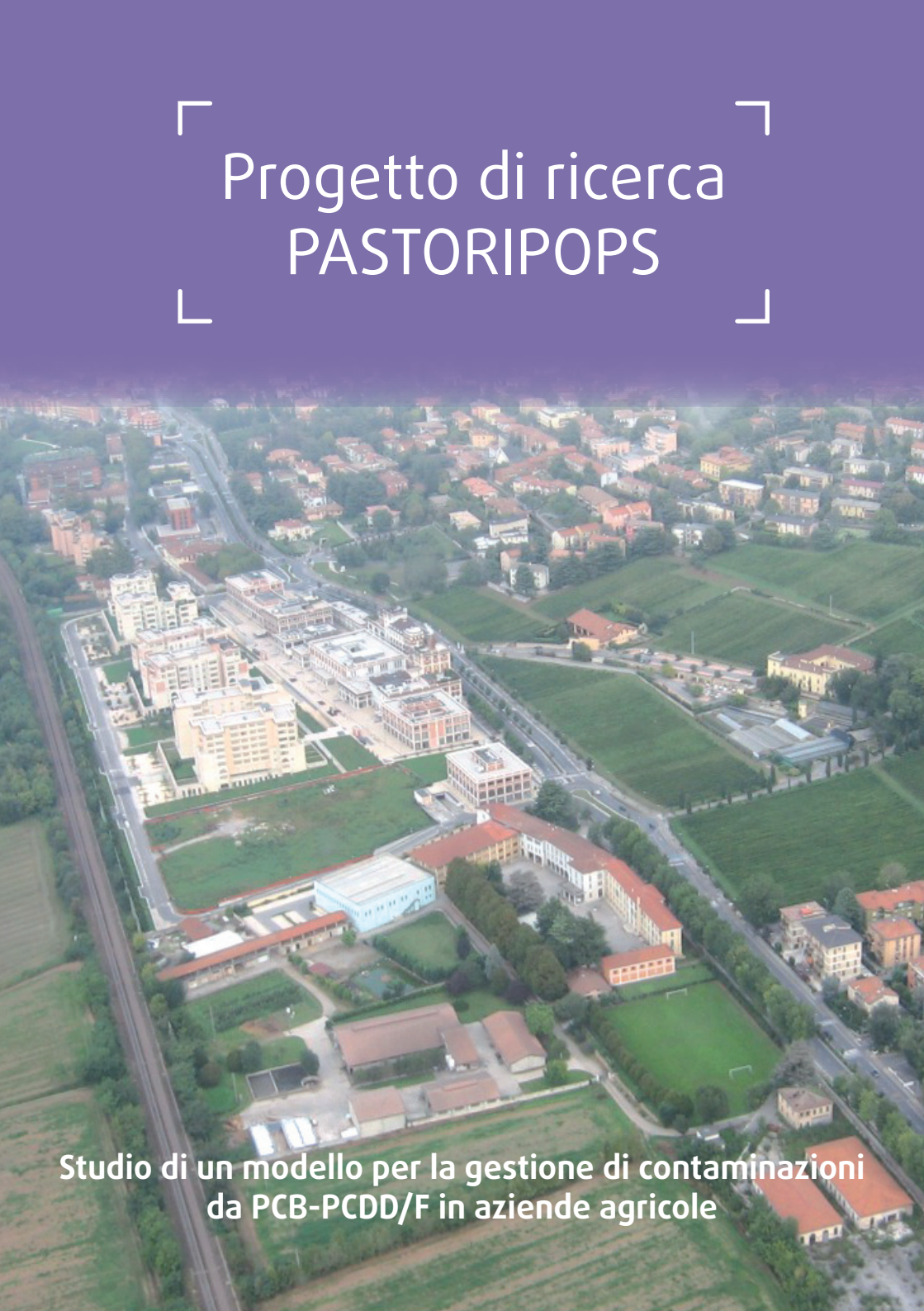




Progetto di ricerca PASTORIPOPS

Studio di un modello per la gestione di contaminazioni
da PCB-PCDD/F in aziende agricole

Progetto di ricerca PASTORIPOPS

Studio di un modello per la gestione di contaminazioni
da PCB-PCDD/F in aziende agricole

grafica

Dario Fenaroli

stampa

Com&Print srl - Brescia

Progetto di ricerca PASTORIPOPS

L'Istituto Tecnico Agrario Statale "G. Pastori" (ITAS Pastori), l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini" (IZSLER), l'Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste della Lombardia (ERSAF) e l'Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani hanno promosso e realizzato il progetto di ricerca *"PASTORIPOPS: Studio di un modello per la gestione di contaminazioni da PCB-PCDDIF in aziende agricole con allevamenti di bovini da latte e da carne: valutazione dei livelli di accumulo e di deplezione dei contaminanti attraverso il controllo degli alimenti e della razione alimentare"*.



Il progetto è stato finanziato da Regione Lombardia – Direzione Generale Agricoltura, Provincia di Brescia, Centrale del latte di Brescia e Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche.



indice

Presentazione.	9
CAPITOLO UNO	11
I composti chimici studiati nel progetto PASTORIPOPS.	
CAPITOLO DUE	15
Attività di ricerca svolta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER): Il latte vaccino.	
CAPITOLO TRE	25
Attività di ricerca svolta da ERSAF Lombardia: Contaminazione dei terreni e delle produzioni vegetali	
CAPITOLO QUATTRO	37
Attività svolta da ITAS PASTORI: Sperimentazione agroeconomica ed animale.	
CAPITOLO CINQUE	39
Attività di ricerca svolta dall'Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani: Analisi statistica dei dati.	

presentazione

Il territorio bresciano vive in un grande dualismo tra industria e agricoltura: nel Comune di Brescia, come in molte aree europee, sono presenti insediamenti industriali, ma esistono anche aziende agricole che si occupano di prodotti destinati all'alimentazione animale e umana.

Questo dualismo genera un indubbio effetto economico, ma anche problemi di inquinamento ambientale.

Nel 2007, a seguito della segnalazione di casi di contaminazione del latte verificatisi nella provincia di Brescia, l'esecuzione di analisi in autocontrollo ha evidenziato che anche l'allevamento di bovine da latte dell'Istituto Tecnico Agrario Statale "Giuseppe Pastori" di Brescia era fra quelli contaminati da sostanze organo clorurate.

L'ubicazione dell'allevamento all'interno di una vasta area comunale, in cui industria ed agricoltura da sempre convivono, ha reso l'azienda dell'ITAS Pastori particolarmente idonea per uno studio che ha avuto lo scopo di analizzare il livello di contaminazione dei terreni, dei foraggi da questi ottenuti, ed il trasferimento di policlorobifenili (PCB), diossine (PCDD) e furani (PCDF) dagli animali ai prodotti alimentari da essi derivati.

Il progetto di ricerca è nato con lo scopo di offrire supporto alle realtà agricole coinvolte in situazioni di emergenza in seguito a problemi di contaminazione da diossine e PCB,

con l'obiettivo di fornire un modello sperimentale efficace, in grado di indicare le modalità operative e le precauzioni necessarie da adottare in attività agricole e zootecniche site in ambiti territoriali a rischio.

Questo lavoro vede protagonista non solo l'Istituto Tecnico Agrario Pastori, ma un sistema di enti che da anni opera sul territorio bresciano e lombardo, raccogliendo informazioni (uniche nel panorama nazionale) sul comportamento delle sostanze organoclorurate nei foraggi e nel latte.

Le produzioni animali e vegetali che sono state oggetto della prova rappresentano non solo una modalità di controllo della salute pubblica ma costituiscono un bioindicatore straordinario dello stato di salubrità dell'ambiente. Ne deriva l'importanza di continuare la sorveglianza, la raccolta, l'integrazione dei dati, l'analisi e l'interpretazione degli stessi anche dopo la fine di questa ricerca.

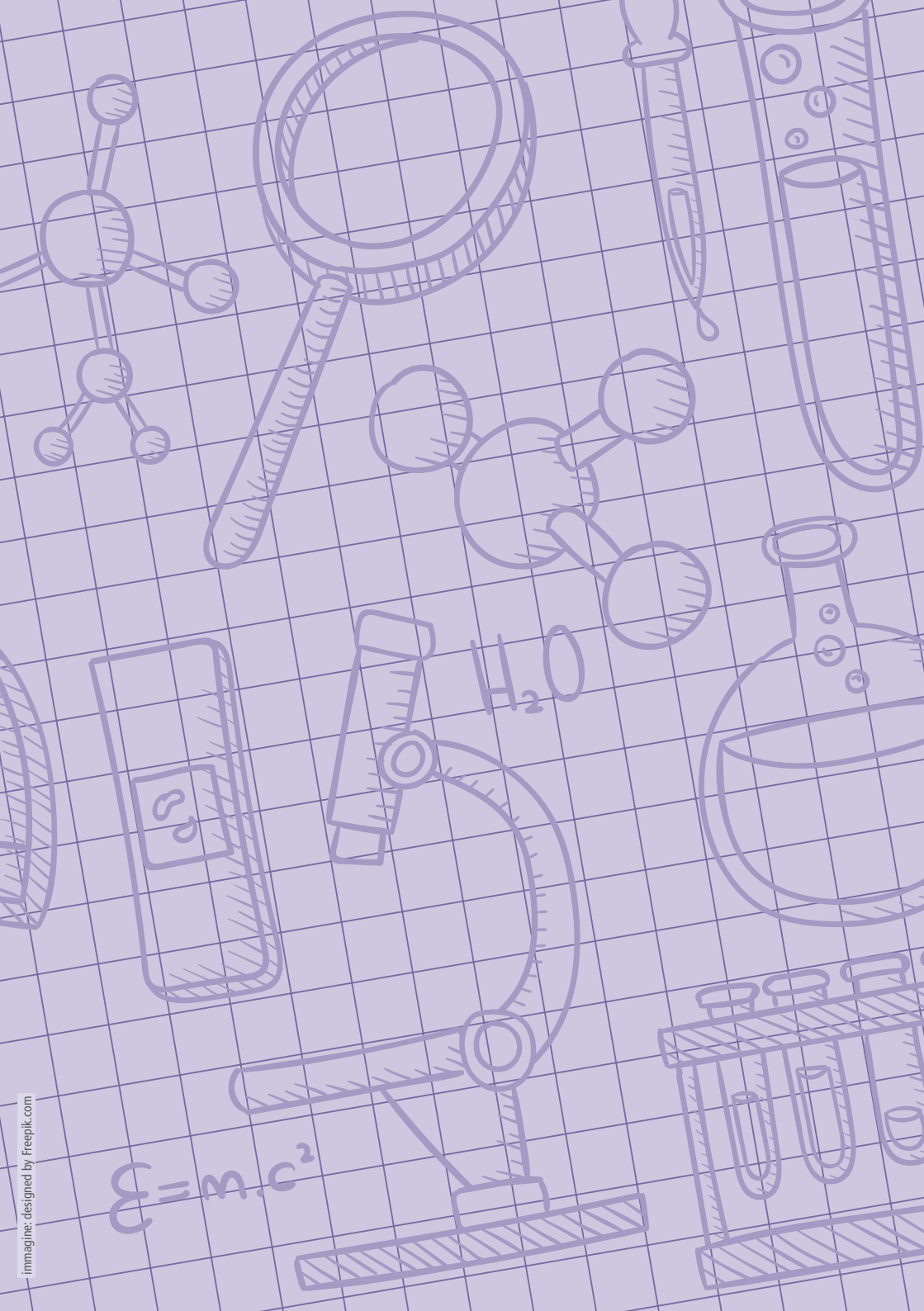
Prof. Augusto Belluzzo
Il Dirigente Scolastico

I COMPOSTI CHIMICI STUDIATI NEL PROGETTO PASTORIPOPS

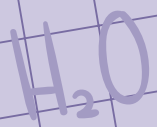
I policlorobifenili (PCB), le policlorodibenzodiossine (PCDD) e i policlorodibenzofurani (PCDF) sono composti chimici organoclorurati, vale a dire molecole in cui esiste almeno un legame carbonio-cloro (C-Cl). Fanno parte dei cosiddetti POPs (Persistent Organic Pollutants - Inquinanti Organici Persistenti), sono, infatti, contaminanti ambientali di origine antropica, difficilmente degradabili, caratterizzati da elevata stabilità chimico-fisica, soggetti a trasporto a lungo raggio e in grado di accumularsi lungo la catena alimentare.

Diossine e furani sono sostanze non prodotte intenzionalmente dall'uomo, ma sono sottoprodotti indesiderati ed inevitabili di diversi processi chimici e termici che avvengono in presenza di cloro. I processi chimici maggiormente responsabili della produzione di queste sostanze sono le lavorazioni industriali per la produzione di plastica, solventi clorurati, pesticidi, carta e oli combustibili. Tra i processi termici causa di emissione di diossine e furani si riconoscono, invece, le combustioni incontrollate di rifiuti urbani e di materie plastiche (gomme o pneumatici), gli incendi boschivi, le eruzioni vulcaniche, la produzione di energia (combustione del legno o di combustibili fossili), i trasporti, il riscaldamento domestico, le combustioni industriali, ecc.

A differenza di diossine e furani, i PCB, sono sostanze chimiche prodotte intenzionalmente dall'uomo, ricavate a partire



$$E=mc^2$$



dal petrolio e dal catrame. La prima sintesi in laboratorio della molecola risale al 1881 in Germania. La produzione su scala industriale ha inizio solo nel 1929 negli USA, da parte di Monsanto, che mette in commercio delle miscele complesse contenenti diversi congeneri di PCB, le miscele "Aroclor". A partire dal 1935 ha inizio la produzione anche in Europa, in seguito alla concessione del brevetto ad alcune industrie chimiche dei principali paesi industrializzati (Germania, Francia, Italia, Spagna, ecc.). In particolare, in Italia, la Caffaro di Brescia è stata l'unica industria ad acquisire il brevetto da Monsanto.

Una volta immessi sul mercato, i PCB hanno da subito avuto un grosso successo commerciale, in quanto composti chimici poco solubili, inerti, non infiammabili, isolanti, resistenti alla degradazione e scarsamente volatili. Risposero a pieno alle esigenze dell'industria elettrica della prima metà del '900, settore all'epoca in forte espansione. Servivano infatti fluidi dielettrici sicuri da utilizzare in trasformatori e condensatori al posto degli oli minerali, utilizzati fino a quel momento, ma pericolosi in quanto molto infiammabili.

Questo fu il principale utilizzo dei PCB, che essendo però sostanze molto versatili, vennero impiegati anche per altri scopi: come additivi negli inchiostri e nelle carte copiative; come elasticizzanti ed impermeabilizzanti in sigillanti, coibentanti, vernici; ecc.

Si stima una produzione di PCB nel mondo superiore al milione di tonnellate; più del 50% della quale è attribuibile a Monsanto. I PCB erano sostanze molto importanti per l'industria, ma evidenziarono da subito problemi di tossicità, soprattutto mostrando effetti avversi nei lavoratori esposti per contatto diretto. Inoltre, nel 1966, i PCB vennero riconosciuti quali contaminanti ambientali in grado di accumularsi lungo la catena alimentare. Proprio per queste loro caratteristiche di tossicità e di bioaccumulo la produzione venne vietata.

In Italia, la Caffaro smise di produrre PCB nel 1984. Nel 1988 venne vietata l'immissione ed il commercio di PCB e delle apparecchiature che li contenevano e nel 1999 ne venne normato anche lo smaltimento.



CAPITOLO DUE

Attività di ricerca svolta
dall'Istituto Zooprofilattico
Sperimentale della Lombardia
e dell'Emilia Romagna (IZSLER):

CONTAMINAZIONE DEL LATTE VACCINO

INTRODUZIONE

Diossine e PCB rappresentano un importante problema di sicurezza alimentare, per questo motivo il progetto PASTORIPOPS ha visto la partecipazione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), ente che lavora per la tutela della salute pubblica e da sempre impegnato nello sviluppo di conoscenze, strumenti e strategie per la sicurezza e la qualità degli alimenti.

L'esposizione della popolazione umana alle diossine e PCB è attribuibile, per più del 90% , all'ingestione di alimenti contaminati, in particolare al consumo di alimenti di origine animale (pesce, carne, prodotti lattiero-caseari, uova). Anche per gli animali allevati, l'accumulo di queste molecole nell'organismo e, di conseguenza, nei loro prodotti avviene principalmente attraverso la via alimentare. Nella vacca da latte, l'ingestione di vegetali e del terreno, che contamina i foraggi durante la loro lavorazione, rappresenta la principale causa di inquinamento del latte e della carne da essa ottenuti.

L'attività di ricerca condotta dall'IZSLER nell'ambito del progetto PASTORIPOPS, ha approfondito le conoscenze sulle modalità di trasferimento, accumulo e deplezione di questi composti chimici nelle bovine da latte, nozioni in

gran parte ancora sconosciute ma di fondamentale importanza per definire i piani di prevenzione e affrontare efficacemente eventuali emergenze di sicurezza alimentare.

A livello ambientale si riconoscono 210 molecole di PCDD/F e 209 di PCB, tuttavia, in sanità pubblica, 35 sono i congeneri di diossine, furani e PCB di interesse per la tutela della salute dell'uomo. In particolare vengono considerati 7 congeneri di PCDD (diossine), 10 congeneri di PCDF (furani), 12 congeneri di DL-PCB (PCB diossina simili) e 6 congeneri di NDL-PCB (PCB non diossina simili). In chimica, i congeneri sono molecole tra loro relazionate per origine, struttura o funzione.

La presenza di queste sostanze negli alimenti è valutata non solo per la loro quantità (concentrazione), ma anche per il loro potenziale tossico. In particolare, l'unità di misura per diossine e PCB diossina-simili, e quindi il livello di contaminazione negli alimenti, è data dalla moltiplicazione della concentrazione (pg/g) di ogni molecola per il suo specifico fattore di tossicità (TEF= fattore di tossicità equivalente). Il risultato finale è quindi espresso in TEQ (tossicità equivalente) (Figura 1). La sommatoria dei TEQ di ciascuna molecola determina il livello di contaminazione e il rischio tossico dell'alimento.

Nel caso degli NDL-PCB, invece, viene considerata solo la loro concentrazione, non essendogli stato attribuito un TEF, in quanto queste molecole mostrano un meccanismo di tossicità differente da quello delle diossine.

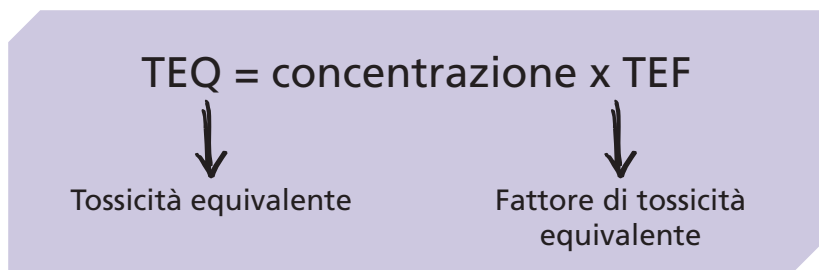


Figura 1
Formula di calcolo della tossicità equivalente (TEO).

Per rilevare la presenza di queste molecole negli alimenti, vengono usati strumenti analitici ad altissima precisione, in grado di determinare quantità molto piccole. Si parla infatti di concentrazioni espresse in ng/g (o µg/kg), vale a dire parti per bilione (ppb), o persino concentrazioni 1.000 volte inferiori, pg/g (o ng/kg), cioè parti per trilione (ppt). Per meglio comprendere la grandezza di quantità così infinitesimali, può risultare utile paragonarle alla misura del tempo:

- 1 ng/g (ppb) equivale ad 1 secondo in 32 anni
- 1 pg/g (ppt) equivale ad 1 secondo in 32.000 anni

L'avvento delle nuove tecnologie e quindi la disponibilità di strumentazioni così precise, in grado di vedere 1 secondo in 32.000 anni, consente oggi la determinazione di concentrazioni in passato non rilevabili. Dal momento che i laboratori sono in grado di determinare contaminazioni infinitesimali, è possibile affermare che non esistono prodotti di origine animale con valori di diossine e PCB pari a zero. Infatti, la diffusione su scala mondiale di queste sostanze, in seguito alla forte antropizzazione dei territori, e la loro persistenza, espongono giornalmente l'ambiente, gli animali e l'uomo a queste molecole. Esistono sicuramente aree più o meno contaminate, in virtù soprattutto della loro storia industriale, ma è difficile ipotizzare l'esistenza di luoghi in cui non sia riscontrabile la presenza, anche solo infinitesimale, di questi composti chimici. A supporto di tale affermazione si evidenzia come anche in una delle zone più remote del mondo, quale l'Antartide, si ritrovano nella fauna selvatica diossine e PCB. Questa contaminazione diffusa, tipica di un territorio, è definita "livello di fondo".

Come stabilito nel 2001, dal comitato congiunto di esperti

dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) e dell'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS), l'inevitabile assunzione di diossine e PCB attraverso gli alimenti, non rappresenta comunque, un problema per la salute dell'uomo, se il livello di contaminazione del cibo è tale da non consentire il superamento della dose tollerabile, fissata a 70 pg/kg di peso corporeo al mese. Questo livello corrisponde alla quantità di diossine che possono essere ingerite mensilmente dall'uomo, durante l'intera durata della sua vita, senza effetti rilevabili sulla sua salute. In aggiunta, il Comitato Scientifico per l'Alimentazione umana (SCF) ha fissato una dose settimanale tollerabile per le diossine e i PCB diossina-simili pari a 14 pg TEQ/kg peso corporeo (2001).

Per garantire la sicurezza del consumatore e rimanere al di sotto delle dosi tollerabili, è necessario lavorare costantemente per ridurre l'esposizione umana dovuta al consumo di alimenti. Dal momento che la contaminazione del cibo è prevalentemente legata alla contaminazione degli alimenti ingeriti dagli animali da reddito, è importante conoscere le dinamiche di accumulo e deplezione delle diossine e dei PCB negli animali, al fine di poter efficacemente controllare l'intera filiera alimentare ed intervenire in caso di emergenza.

In questo contesto si inserisce la sperimentazione svolta dall'IZSLER nell'ambito del progetto di ricerca PASTORIPOPS. Per meglio comprendere l'attività realizzata dai ricercatori IZSLER, è però necessario un breve cenno alla legislazione europea in materia di diossine e PCB.

La strategia comunitaria sulle diossine, i furani e i PCB ha come obiettivo la riduzione del tenore di queste sostanze nei mangimi e negli alimenti. La Comunità Europea, al fine di ridurre la presenza di diossine, furani e PCB nella catena alimentare, ha stabilito dei **valori massimi** e delle **soglie di intervento**. I prodotti alimentari o i mangimi che superano il **tenore massimo**, indicato dalla normativa europea,

non possono essere commercializzati, mentre la soglia di intervento, o livello di azione, funziona da segnale di avvertimento ed è uno strumento ad uso delle autorità competenti e degli operatori per evidenziare i casi in cui è opportuno individuare una fonte di contaminazione e prendere provvedimenti per la sua riduzione od eliminazione.

Nelle **Tabelle 1** e **2** sono riportati i livelli legislativi massimi e di azione relativi alle matrici considerate nell'attività sperimentale dell'IZSLER. I limiti sono espressi per le diverse categorie di molecole: diossine e furani (PCDD/F), PCB diossina simili (DL-PCB), sommatoria diossine, furani e PCB diossina simili (PCDD/F + DL-PCB), PCB non diossina simili (NDL-PCB).

		Materie prime per mangimi di origine vegetale	Premiscele	Mangimi composti
Limiti massimi	PCDD/F (ng TEQ/kg 12% Umidità)	0,75	1,00	0,75
	PCDD/F + DL-PCB (ng TEQ/kg 12% Umidità)	1,25	1,50	1,50
	NDL-PCB (µg/kg 12% Umidità)	10	10	10
Limiti di azione	PCDD/F (ng TEQ/kg 12% Umidità)	0,50	0,50	0,50
	DL-PCB (ng TEQ/kg 12% Umidità)	0,35	0,35	0,50

Tabella 1
Limiti legislativi alimenti zootecnici
(estratto da Regolamento UE N. 277/2012).

		Latte crudo e prodotti lattiero-caseari
Limiti massimi	PCDD/F (pg TEQ/g grasso)	2,50
	PCDD/F + DL-PCB (pg TEQ/g grasso)	5,50
	NDL-PCB (ng/g grasso)	40
Limiti di azione	PCDD/F (pg TEQ/g grasso)	1,75
	DL-PCB (pg TEQ/g grasso)	2,00

Tabella 2

Limiti legislativi prodotti alimentari (estratto da Regolamento UE N. 1259/2011 e Raccomandazione N. 2014/663/UE).

PROVA SPERIMENTALE

Per attuare il disegno sperimentale la mandria di bovine da latte dell'azienda ITAS Pastori è stata valutata in base alla gestione, all'origine e al livello di contaminazione degli alimenti e in base al valore di contaminazione di fondo del latte giornalmente munto.

Dopo queste scelte preliminari, sono state selezionate 8 bovine in produzione, di diversa età e in fasi diverse di lattazione. Quattro vacche sono state alimentate con una razione artificialmente contaminata, in modo da esporle ad una quantità conosciuta di diossine e PCB. A tale scopo, sono state effettuate, numerose prove per valutare ed identificare la modalità più adatta di somministrazione agli animali della razione contaminata, nel pieno rispetto del loro benessere.

Essendo previsto nella sperimentazione il coinvolgimento diretto degli animali, il protocollo di ricerca è stato valutato ed approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Zooprofilattico.

Sperimentale, ed è stata inoltre informata l'Autorità Sanitaria Locale, che ha ispezionato i box di stabulazione degli animali

e ha controllato lo smaltimento del latte da essi ottenuto.

Le 8 vacche scelte per la sperimentazione sono state suddivise in due gruppi: gruppo sperimentale (4 capi) e gruppo controllo (4 capi). Per ciascuna vacca è stato valutato il livello di contaminazione iniziale del latte (livello di fondo), la qualità di latte prodotto, il peso, la condizione corporea e le condizioni sanitarie e metaboliche.

I soggetti del gruppo sperimentale sono stati alimentati con la razione artificialmente contaminata. Gli animali del gruppo di controllo sono stati alimentati con la medesima razione non contaminata.

Il livello di contaminazione della razione giornaliera è stato calcolato in modo da somministrare a ciascun capo del gruppo sperimentale una quota di diossine e PCB appena inferiore alla quantità che avrebbero ingerito nel caso in cui tutti gli alimenti della razione fossero stati contaminati con valori prossimi ai limiti che ne regolano la commercializzazione (Regolamento UE N. 277/2012: limiti per mangimi composti).

Nel definire il contenuto di molecole e, in particolare, il rapporto tra diossine e PCB, si è scelto di riprodurre una situazione simile a quella del territorio bresciano, nel quale prevale la contaminazione da PCB.

Per alimentare le vacche del gruppo sperimentale sono state predisposte delle mangiatoie al fine di consentire un'adeguata, controllata e completa somministrazione dell'alimento contaminato a ciascun capo (**Figura 2**). Per tutta la durata della sperimentazione è stato monitorato lo stato sanitario e metabolico degli animali, la quantità e la qualità del latte prodotto, il peso e la condizione corporea.

I contaminanti sono stati somministrati al gruppo sperimentale per 7 settimane, al termine delle quali le vacche sono state alimentate per altre 6 settimane con la medesima razione, ma non contaminata.

Il latte prodotto dagli animali è stato analizzato, per la determinazione del contenuto in PCDD/F e PCB, con cadenza settimanale, al fine di ottenere informazioni sulle dinamiche metaboliche delle sostanze indagate.



Figura 2

Somministrazione della razione contaminata alle vacche del gruppo in sperimentazione.

RISULTATI

Il latte, prodotto dalle vacche che ricevevano i contaminanti attraverso la dieta, ha superato il limite massimo stabilito per la somma di PCDD/F e DL-PCB (5,5 pg TEQ/g di grasso, Regolamento UE N. 1259/2011), tra la prima e la seconda settimana di sperimentazione. Dopo la terza settimana le vacche hanno raggiunto lo “stato stazionario”, ovvero lo stato in cui la velocità di assunzione del contaminante per via orale viene compensata da quella di eliminazione attraverso il latte, che, di conseguenza, non ha più mostrato importanti oscillazioni nel suo livello di contaminazione. La conformità del latte è stata ripristinata dopo circa una settimana dalla sospensione della somministrazione delle molecole (**Figura 3**). Per quanto riguarda invece gli NDL-PCB, il livello massimo (40 ng/g di grasso, Regolamento UE N. 1259/2011) è stato superato in media tra la quarta e la quinta settimana di somministrazione, anche in questo caso, una volta sospesa la somministrazione, il ripristino della conformità è stato molto rapido (1 settimana) (**Figura 4**).

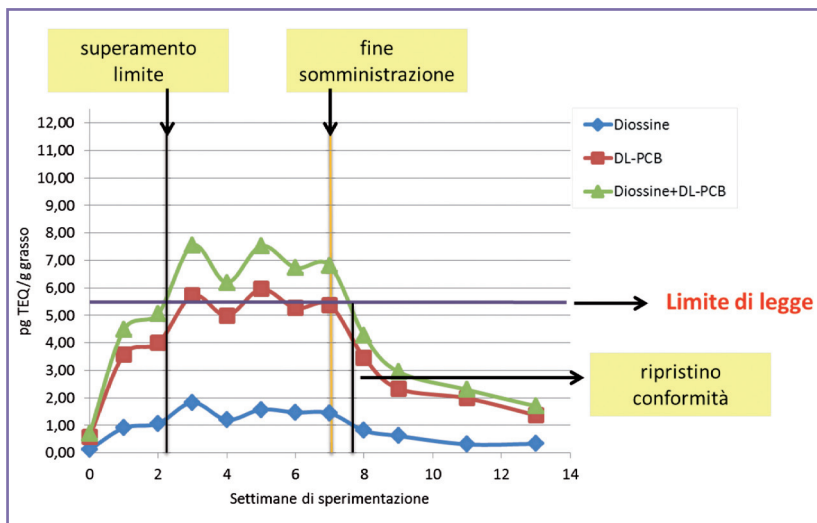


Figura 3
Esempio di curva di accumulo e di deplezione per PCDD/F e DL-PCB di una vacca del gruppo in sperimentazione.

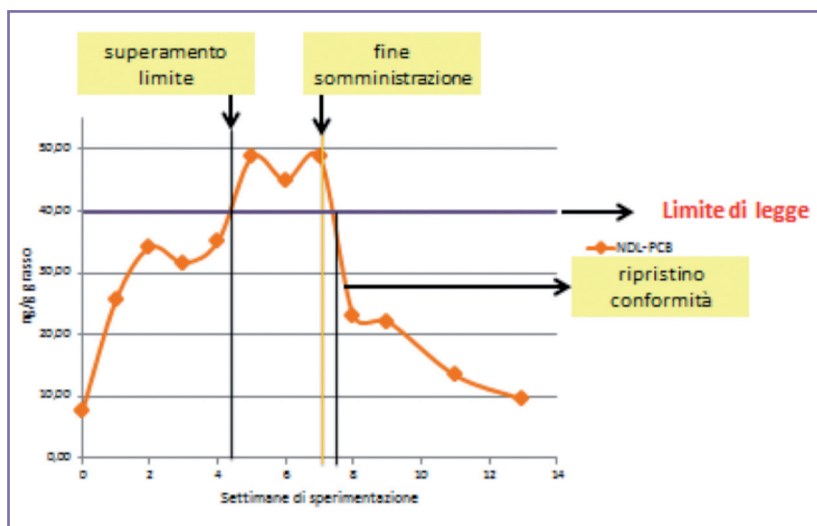


Figura 4
Esempio di curva di accumulo e di deplezione per NDL-PCB di una vacca del gruppo in sperimentazione.

L'analisi dei dati ha consentito di verificare che, dopo l'interruzione della somministrazione, quasi tutte le molecole somministrate agli animali ritornano al livello iniziale (**Tabella 3**).

N° giorni impiegati per il ritorno al livello iniziale dopo sospensione della somministrazione	N° molecole che ritornano al livello iniziale
7	13
14	2
28	7
42	6
Mai	4
Comportamento anomalo	3

Tabella 3

Numero di giorni impiegati dalle molecole per ritornare al livello iniziale dopo sospensione della somministrazione.

CONCLUSIONI

Tutte le informazioni fino ad ora ottenute dalla ricerca, e quelle che risulteranno dall'elaborazione dei dati ancora in corso, potranno essere utilizzate per meglio individuare le fonti contaminanti e le strategie da adottare nel caso di superamento dei livelli massimi tollerabili nei prodotti lattiero-caseari.

Ad oggi, grazie ai risultati raggiunti con il progetto PASTORIPOPS sono state effettuate 3 comunicazioni a convegni internazionali ed 1 pubblicazione su rivista specializzata. Inoltre, l'esperienza effettuata è risultata utile durante la partecipazione ai tavoli tecnici promossi dall'A.S.L. di Brescia e dal comune di Brescia e per dare supporto ai veterinari A.S.L. della Regione Lombardia nella definizione di protocolli operativi per la gestione del problema sul campo.

CAPITOLO TRE

Attività di ricerca svolta da ERSAF Lombardia: **CONTAMINAZIONE DEI TERRENI E DELLE PRODUZIONI VEGETALI**

Nel progetto PASTORIPOPS, ERSAF ha seguito il filone della ricerca teso a **individuare i caratteri della contaminazione dei terreni** (sua entità e natura dei contaminanti¹) dei terreni, indagando l'interazione tra terreni con presenza di contaminanti e colture praticate per comprendere le modalità e l'entità del loro trasferimento dal terreno all'alimento vegetale con l'obiettivo di **individuare la tipologia ed il livello di contaminazione degli alimenti vegetali** prodotti sui terreni aziendali, che a suo tempo, avevano causato l'inquinamento del latte.

Il fine di tale studio è stato quello di esplorare la possibilità di **ottenere alimenti zootecnici a basso livello di contaminazione seppur prodotti nelle aree indagate**, comprendere i motivi che conducono a tale contenimento e di conseguenza predisporre un piano agronomico alternativo per l'utilizzo dei terreni.

ERSAF ha inoltre condotto una sperimentazione volta a verificare la possibilità di ridurre la contaminazione dei terreni mediante l'azione di fitorimedio svolta dalle piante.

¹ Limitatamente ai congeneri normalmente ricercati nelle famiglie delle diossine/furani e dei PCB.

LE ATTIVITÀ REALIZZATE

In completa sinergia con l'Istituto Tecnico Agrario Sperimentale G. Pastori (ITAS Pastori) e con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), ERSAF ha studiato, nei due anni della ricerca, gli effetti di un **piano agronomico** appositamente predisposto per confrontare l'eventuale accumulo dei contaminanti in diverse specie foraggere, col duplice scopo di

- verificare il **passaggio dei contaminanti dal terreno alle piante**,
- verificare le **differenze di accumulo tra parti diverse della stessa specie** (radici vs foglie/fusti), e **tra specie diverse**.

Nelle due aree prescelte per tale studio è stata effettuata una doppia sessione di ***campionamento ed analisi dei terreni***, la prima all'avvio del primo anno di sperimentazione e la seconda al termine del secondo anno (in concomitanza del raccolto dei foraggi prodotti), al fine di verificare eventuali variazioni nell'entità della contaminazione "prima" e "dopo" la sperimentazione.

In parallelo, in distinti momenti dei due anni di sperimentazione ed in corrispondenza di fasi significative della crescita delle piante, è stato effettuato il ***campionamento delle biomasse vegetali***, anch'esse sottoposte ad analisi chimica.

PIANO AGRONOMICO E SPERIMENTAZIONE

Il Piano Agronomico della sperimentazione è stato predisposto da ERSAF, in stretta collaborazione con il responsabile delle attività agronomiche per l'azienda ITAS Pastori, nel rispetto dei vincoli di utilizzo dei terreni i quali hanno guidato la scelta dei campi da destinare alla sperimentazione (figg. 1 e 2).

Il Piano Agronomico è sostenuto da una solida analisi bibliografica che ha orientato la scelta delle specie vegetali

da coltivare privilegiando, fra le specie citate in precedenti studi di bio-fitorimediazione, quelle che abbiano dato qualche risultato positivo e siano adatte al contesto ambientale e produttivo bresciano; esso sposa inoltre la prescrizione, al cui rispetto è subordinata l'autorizzazione di A.S.L. alla coltivazione, di produrre mangimi che derivino dal taglio delle piante ad altezza di almeno 40 cm dalla superficie del suolo. Tale prescrizione consente dal 2008 all'azienda ITAS Pastori di alimentare le sue vacche con foraggi coltivati sui propri terreni che, come dimostrato da periodiche analisi, presentano un basso livello di contaminazione da PCB, diossine e furani².

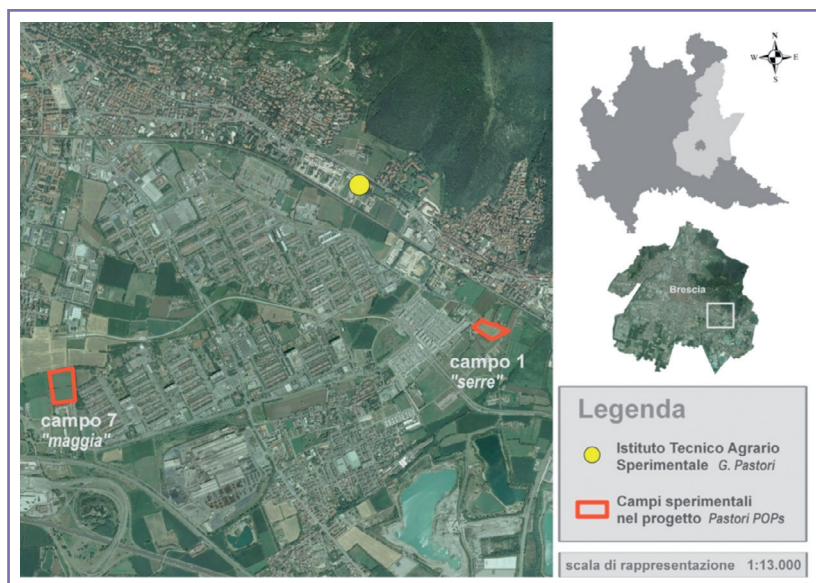


Figura 1
Campi destinati alla sperimentazione nel progetto PASTORIPOPS.

² Le molecole dei "POPs" sono difficilmente assorbite nei tessuti vegetali; la contaminazione negli insilati è attribuita alle particelle di terreno contaminato, adese ai fusti e foglie delle piante principalmente nella loro parte basale. Il taglio a 40 cm o più dal suolo garantisce prodotti molto più puliti rispetto a una eventuale contaminazione "tellurica".



Figura 2

Dettaglio dei due campi sperimentali maggia e serre.

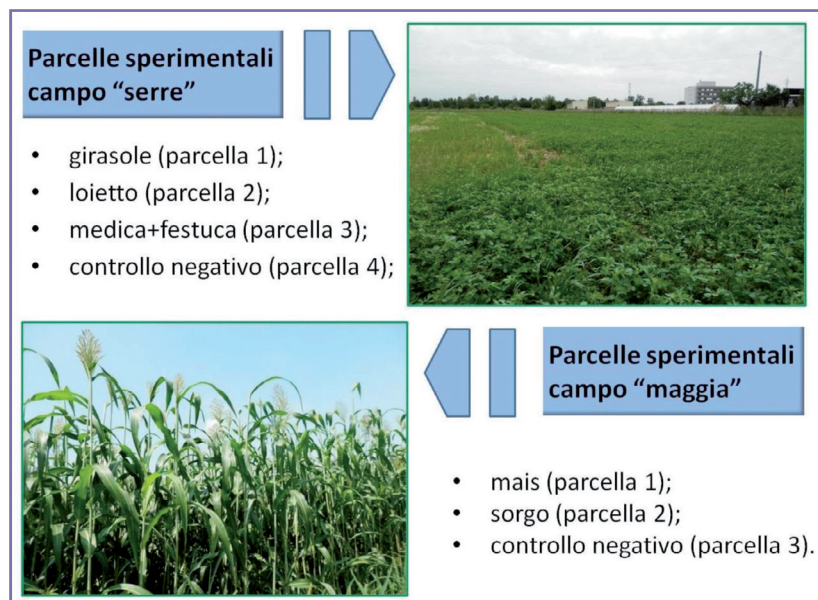


Figura 3

Parcelle sperimentali nei campi maggia e serre.

Le specie vegetali selezionate per la sperimentazione sono:

Girasole (<i>Helianthus annuus</i>)	Mais (<i>Zea mays</i>)
Erba Medica (<i>Medicago sativa</i>)	Sorgo (<i>Sorghum vulgare</i>)
Festuca (<i>Festuca arundinacea</i>)	Loietto italico (<i>Lolium multiflorum</i>)

La loro coltivazione risponde a due distinte tesi sperimentali. La prima (**tesi 1**) è indirizzata a seguire, verificare e confermare la prescrizione che prevede la coltivazione di mais da granella e insilati (di mais o di sorgo) **raccolti con taglio della pianta ad altezza di 40 cm o più dal suolo**, mediante coltivazione di **mais e sorgo** nel campo 7 "maggia". Alle due specie è stata affiancata una **coltura di controllo** (erbaio con produzione di fieno e sfalcio a 5 cm dal suolo) per verificare le differenze ipotizzate fra le due tecniche colturali nel trattenere e/o assorbire parte del contaminante. La seconda (**tesi 2**) è orientata a verificare la possibilità che alcune colture vegetali abbiano la capacità di assorbire i composti organo-clorurati, con l'obiettivo di ridurre l'entità della contaminazione, mediante coltivazione di **girasole, loietto** e dell'associazione **festuca + medica** nel campo 1 "serre"; anche in questo caso è stata affiancata una **coltura di controllo** (si veda tesi 1).

Di seguito (**tabella1** pag. seguente), in sintesi, specie coltivate per anno e campo sperimentale, con indicazione delle superfici occupate e delle diverse parti delle piante campionate ed analizzate nel corso della ricerca.

Le avverse condizioni meteorologiche della primavera 2013 hanno causato il posticipo delle semine del mais, sorgo e girasole al periodo fine maggio- inizio giugno; la semina di medica/festuca e di loietto è avvenuta invece a fine settembre. In quest'ultimo caso i raccolti sono stati effettuati nel 2014, determinando lo slittamento anche delle analisi sulle relative biomasse.

Anni	Campi	Specie Vegetali coltivate	Superficie occupata (ha)	Parti delle piante analizzate
2013	1 serre	girasole	0,4	foglie
				fusti
				radici
				semi
	7 maggia	mais	1	trinciato
		sorgo	0,2	trinciato
		erba ³	0,2	fieno
2014	1 serre	loietto	0,4	fieno
				parti aeree
				radici
		festuca + medica	0,4	parti aeree festuca
				parti aeree medica
				radici festuca
				radici medica
				fieno festuca+medica
		erba ³	0,1	fieno

Tabella 1

Prospetto sintetico della sperimentazione.

CAMPIONAMENTO ED ANALISI DEI TERRENI

La caratterizzazione chimica finalizzata a determinare il **contenuto di PCB e diossine/furani** nei campi oggetto della sperimentazione è stata articolata in due sequenze identiche da realizzare a inizio e fine sperimentazione. Durante l'estate 2013 è stata effettuata la prima fase dell'indagine.

Due campioni rappresentativi di ogni parcella corrispondente a una coltura sperimentale (girasole, mais, sorgo, loietto, medica+festuca) e **ai controlli** (due prati) sono stati prelevati alla doppia profondità 0-30 cm e 30-60 cm dalla

.....
3 Parcella lasciata a prato come controllo negativo della sperimentazione ("bianco").

superficie del suolo, per un totale di 14 campioni. Ogni campione è stato costituito mediante prelievo di 6/8 sottocampioni all'interno della stessa coltura, la cui ubicazione è stata registrata con GPS per ripetere nella fase 2 il prelievo negli stessi punti. I sottocampioni sono stati accuratamente miscelati ed omogeneizzati ed una loro aliquota è stata sottoposta a determinazione chimica.

Sui 14 campioni sono stati ricercati i parametri PCB (33 congeneri) in bassa risoluzione e diossine/furani (17 congeneri) in alta risoluzione. Sui 7 campioni superficiali (0-30 cm) è stata inoltre ripetuta la ricerca in alta risoluzione di un ristretto gruppo di PCB (28 congeneri) per verificare eventuali differenze significative tra le due metodiche. Il confronto ha evidenziato una buona corrispondenza tra i rispettivi set analitici.

La seconda fase dell'indagine è stata attuata con le stesse modalità nell'agosto 2014. Con l'ausilio di un GPS sono stati identificati in campo i punti di prelievo dei singoli sottocampioni prelevati nel 2013. Ove possibile il campionamento 2014 è avvenuto nello stesso punto o, laddove siano stati riscontrati impedimenti, nelle sue immediate vicinanze. Anche l'ubicazione di questi punti è stata registrata mediante strumento GPS.



Figura 4
Alcune fasi del campionamento terreni 2013.

La tabella seguente illustra i risultati delle analisi chimiche effettuate nel progetto⁴ poste a confronto con le determinazioni effettuate da ARPA nel 2008⁵.

	ID	sigla	prof. prelievo (cm)	Concentrazioni PCB - somma 33 congeneri (µg/kg s.s.)			Concentrazioni somma PCDD/PCDF (ng I-TEF/kg s.s.)		
				ARPA 2008	ERSAF 2013	ERSAF 2014	ARPA 2008	ERSAF 2013	ERSAF 2014
Campo 1 - Serre	1	G1	0 - 30		22,44	17,97		1,8	1,99
	2	G1	30 - 60		13,45	13,46		1,28	1,14
	3	L1	0 - 30		17,07	12,59		1,56	1,3
	4	L1	30 - 60		21,8	19,04		1,47	1,97
	5	F1	0 - 30		16,84	17,7		1,88	1,66
	6	F1	30 - 60		19,07	9,03		1,39	1,04
	7	B1	0 - 30		27,01	18,24		1,95	2,16
	8	B1	30 - 60		22,64	20,21		1,44	2,08
Media intero campo				22,9	20,04	16,03	2,2	1,6	1,67
Campo 2 - Maggia	1	B7	0 - 30		31,49	19,35		3,58	2,68
	2	B7	30 - 60		23,53	14,43		1,99	1,27
	3	S7	0 - 30		36,06	22,45		2,93	2,93
	4	S7	30 - 60		19,24	9,3		1,81	1,1
	5	M7	0 - 30		42,11	24,33		4,81	3,21
	6	M7	30 - 60		27,39	13,91		3,11	1,39
Media intero campo				16,9	29,97	17,3	4,9	3,04	2,1
Limiti tab.1 col. A d.Lgs 152/2006				60			10		

Tabella 2

Raffronto tra analisi PCB e PCDD/F progetto PASTORIPOPS e precedenti analisi ARPA. Sigle campioni: G = girasole; L = loietto; F = prato medica/festuca; M = mais; S = sorgo; B = bianco; i numeri che seguono la lettera maiuscola individuano il campo sperimentale.

4 Determinazioni mediante gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa in alta risoluzione (PCDD/PCDF ossia diossine/furani) e bassa risoluzione (PCB).

5 Unico campione composito (prelievi ai vertici e al centro dei singoli campi indagati; determinazione mediante gas-cromatografia - spettrometria di massa in bassa risoluzione).

Da un'analisi di questi dati, sostanzialmente confrontabili con quelli prodotti da ARPA nel 2008, emerge come elemento più rilevante la constatazione che **i terreni dell'ITAS Pastori oggetto di studio non sono classificabili come contaminati** ai sensi della normativa attuale, con riferimento alla colonna A della tabella 1, allegato 5 al Titolo V, Parte IV del d.lgs 152/2006⁶.

CAMPIONAMENTO ED ANALISI DELLE BIOMASSE

I foraggi prodotti per i quali si sono studiati i livelli di contaminazione sono stati:

Tipo di foraggio	note agronomiche	campo
insilato di mais	taglio a 35 cm da terra	campo "maggia"
insilato di sorgo	taglio a 20 cm da terra	
fieno da prato	taglio a 5 cm da terra	
fieno di loietto	taglio a 6/7 cm da terra, 1 rivoltamento e messa in andane	campo "serre"
fieno di medica/festuca	taglio a 6/7 cm da terra, 1 rivoltamento e messa in andane	

Tabella 3

Tecniche culturali applicate alle diverse colture sperimentate.

Di seguito (**tabella 4** pag. seguente) i risultati delle analisi chimiche effettuate sui diversi foraggi testati, presentati in formato tabellare per una migliore leggibilità.

.....
6 Il confronto viene fatto con la colonna A (limiti per suoli adibiti a uso residenziale e a verde pubblico) essendo questa la più restrittiva, in mancanza di limiti specifici per le aree agricole.

FORAGGI	PCDD/F		Σ PCDD/F + PCB dl		Σ PCDD/F + PCB dl
	concentrazioni rilevate nei FORAGGI	limite d'azione/ massimo per FORAGGI Reg. UE 277/2012	concentrazioni rilevate nei FORAGGI	limite massimo per FORAGGI Reg.UE 277/2012	concentrazioni rilevate nei TERRENI 2013/2014
	(ng WHO TEQ/kg)		(ng WHO TEQ/kg)		(ng WHO TEQ/kg)
Insilato di mais	0,17	0,5/0,75	0,32	1,25	7,23/4,83
Insilato di sorgo	0,19	0,5/0,75	0,55	1,25	4,90/4,41
Fieno erbe spontanee	0,5	0,5/0,75	1,05	1,25	5,31/4,14
Fieno loietto	0,18	0,5/0,75	0,43	1,25	2,74/2,04
Fieno medica/ festuca	0,18	0,5/0,75	0,55	1,25	3,15/2,58

Tabella 4

Qualità dei foraggi prodotti riferiti alle diossine/furani e PCB dioxin like. Evidenziato su sfondo giallo valore uguale al livello d'azione ai sensi del Reg. UE 277/201 sulla qualità dei foraggi.

FORAGGI	PCB dl		PCB n-dl		Σ PCDD/F + PCB dl
	concentrazioni rilevate nei FORAGGI	limite d'azione per FORAGGI Reg.UE 277/2012	concentrazioni rilevate nei FORAGGI	limite massimo per FORAGGI Reg.UE 277/2012	concentrazioni rilevate nei TERRENI 2013/2014
	(ng WHO TEQ/kg)		(ng WHO TEQ/kg)		(ng WHO TEQ/kg)
Insilato di mais	0,14	0,35	3	10	7,23/4,83
Insilato di sorgo	0,36	0,35	3	10	4,90/4,41
Fieno erbe spontanee	0,55	0,35	4,73	10	5,31/4,14
Fieno loietto	0,25	0,35	3,07	10	2,74/2,04
Fieno medica/ festuca	0,37	0,35	3,03	10	3,15/2,58

Tabella 5

Qualità dei foraggi prodotti riferiti ai PCB dioxin like e non. Evidenziati su sfondo giallo valori uguali al livello d'azione ai sensi del Reg. UE 277/201 sulla qualità dei foraggi.

Dall'analisi dei dati ottenuti si possono evidenziare alcune criticità, in particolare per il fieno ottenuto dalla parcella lasciata a prato che è stato raccolto non seguendo particolari accorgimenti e quindi secondo la prassi comune con un taglio basso, a circa 5 cm dal piano campagna.

Anche l'insilato di sorgo ha raggiunto dei livelli prossimi a quelli di azione per i DL-PCB; si evidenzia in questo caso l'inferiore altezza di taglio rispetto all'insilato di mais il quale è risultato decisamente più "pulito".

CAPITOLO QUATTRO

Attività svolta
da ITAS PASTORI:

SPERIMENTAZIONE AGRONOMICA ED ANIMALE

SPERIMENTAZIONE AGRONOMICA

Collaborazione tecnica per lo sviluppo del piano agronomico:

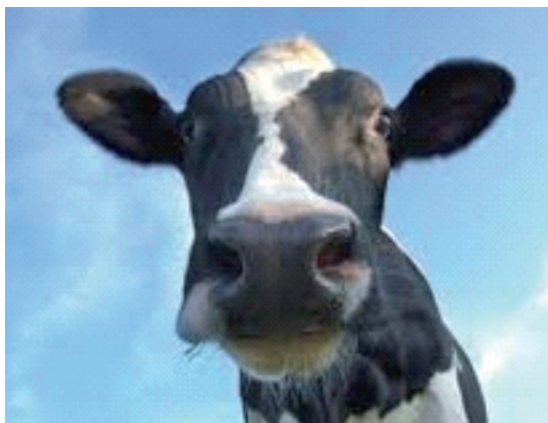
- Lavorazione dei terreni
- Gestione delle colture (dalla semina al raccolto)
- Campionamento
 - ➔ Terreno
 - ➔ Vegetali
 - ➔ Foraggi



SPERIMENTAZIONE ANIMALE

Supporto tecnico all'impostazione e realizzazione della prova sperimentale per la definizione del livello di accumulo e deplezione dei composti organoclorurati nel latte vaccino:

- Allevamento a cura di 8 vacche da latte di razza frisona
- Supporto per la valutazione delle condizioni sanitarie e metaboliche
- Gestione smaltimento latte non conforme
- Management e attività amministrativa



CAPITOLO
CINQUE

Attività di ricerca svolta
dall'Istituto Sperimentale Italiano
Lazzaro Spallanzani:

ANALISI STATISTICA DEI DATI

Nell'ambito del progetto PASTORIPOPS, l'Unità Operativa rappresentata dall'**Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani** (ISILS) si è occupata dell'analisi statistica dei dati raccolti nell'ambito dell'attività sperimentale eseguita dalle Unità Operative: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) e Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste (ERSAF).

ANALISI DEL LATTE DOPO ASSUNZIONE DI FORAGGIO ARTIFICIALMENTE CONTAMINATO

I dati del dosaggio nel latte delle diossine e PCB considerati nella ricerca sono stati analizzati statisticamente tramite approccio farmacocinetico.

La farmacocinetica è lo studio di che cosa un corpo fa con una dose di principio attivo (cinetica = movimento). In particolare vengono considerati i seguenti elementi: assorbimento, distribuzione, metaboliti, escreti. La farmacodinamica studia invece che cosa il principio chimico fa al corpo (dinamica = cambiamento).

La farmacocinetica prevede il computo di *endpoints*, quali:

- C_{max}, concentrazione massima;
- T_{max}, tempo per raggiungere C_{max};

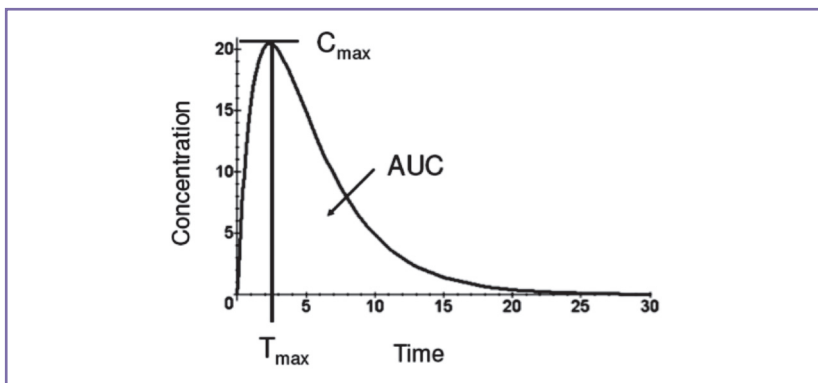
- AUC, (area sotto la curva) quantità di farmaco immutato che raggiunge la circolazione sistemica dopo somministrazione di una determinata dose, direttamente proporzionale alla quantità di farmaco assorbito;
- Emivita, tempo necessario perché la concentrazione plasmatica (all'equilibrio di distribuzione) si riduca della metà;
- Clearance;
- Volume.

Gli *endpoints* consentono di caratterizzare l'esposizione ad un principio attivo.

Quale esempio, nella figura seguente si evidenzia il classico andamento della concentrazione di un principio attivo, dopo la sua somministrazione in singola dose, ed in tale andamento si evidenziano alcuni *endpoints* d'interesse.

La farmacocinetica considera vari approcci di modellizzazione a seconda si consideri l'organismo quale "scatola nera", modello ad un compartimento, o si "scomponga" l'organismo in più distretti (compartimenti), ognuno con una particolarità fisiologica.

In fattispecie il dataset fornito dallo IZSLER conteneva i dosaggi dei congeneri somministrati e la concentrazione degli



stessi valutata nel latte. I dati sono stati studiati tramite due approcci: identificazione dello *steady state* e il calcolo dei tempi di eliminazione.

Identificazione dello steady state - L'approccio utilizzato é stato quello della ricerca dello *steady state*, ovvero l'identificazione della concentrazione alla quale la funzione che descrive la concentrazione di un dato congenere nel latte si stabilizza. A tal fine é stato sviluppato un idoneo modello matematico.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che buona parte dei congeneri raggiunge lo *Steady State*, come sintetizzato nella seguente tabella.

Steady State (giorno)	Congeneri (n)
14	2
21	12
28	8
35	4
42	1
n.d.	8

Calcolo dei tempi di eliminazione - É stato utilizzato un modello statistico di tipo generale lineare per identificare, dopo la fine della somministrazione del congenere, il momento nel quale nel latte la concentrazione del congenere nel latte ritorna al livello basale (concentrazione iniziale al momento della somministrazione).

I risultati ottenuti evidenziano che quasi tutti i congeneri dopo l'interruzione della somministrazione ritornano al livello basale, come sintetizzato nella seguente tabella.

Ritorno al livello basale (prelievo)	Congeneri (n)
9	13
10	2
11	7
12	6
Mai	4
Comportamento anomalo (solo picchi)	2

ANALISI DEL TERRENO E DELLE PRODUZIONI VEGETALI

Sono stati analizzati i dataset forniti dall'ERSAF, relativi allo studio della contaminazione dei terreni e dei foraggi ivi coltivati. Le molecole considerate erano rappresentate da: PCB (33 congeneri), PCDD/PCDF (17 congeneri). I congeneri sono stati identificati tramite gli identificativi codificati da ERSAF.

Gli effetti di variabilità considerati per l'analisi sono stati i seguenti:

- ANNO = 2013 (1); 2014 (2)
- CAMPO = 1; 2
- PARCELLE = 4 in CAMPO 1; 3 in CAMPO 2
- PROFONDITA' = 0-30 cm (1); 30-60 cm (2)
- ANALISI = LR (1); HR (2)
- SPECIE VEGETALE = 1 - 4
- PARTE VEGETALE = 1 - 4;
- CONSERVAZIONE = Verde (1), fieno (2)

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati diversi modelli generali lineari.

I risultati dell'elaborazione statistica vengono riportati per i punti di maggior interesse.

Il profilo di contaminazione non è risultato omogeneo a livello di campo per le seguenti molecole (PCB): NP20, NP24, NP25, NP27, NP29, NP31, NP35.

I profili di contaminazione per le due profondità di terreno

considerate sono risultati diversi per le seguenti molecole (PCB): NP20, NP24, NP25, NP27, NP29, NP31, NP35.

L'effetto della **parcella** di terreno è stato evidenziato per le seguenti molecole (PCB): NP20, NP24, NP27, NP20, NP24, NP25, NP27, NP35.

L'effetto dell'**anno** è stato evidenziato per le seguenti molecole (PCB): NP20, NP22, NP24, NP25, NP27, NP29, NP31, NP35, P5+P6.

Relativamente alle due **risoluzioni** analitiche, le molecole (PCB) che hanno presentato differenze significative sono state: NP20, NP22, NP24, NP27, NP29.

Sono state studiate le **associazioni** lineari tra il profilo delle molecole rilevate nella **pianta** e quello dei **terreni** della parcella di terreno corrispondente, evidenziando i valori riportati in tabella, nella quale si evidenzia una forte correlazione fra quanto misurato nel terreno e quanto misurato nelle radici.

Specie		Parte		r
1	Girasole	1	Semi	0,63
		2	foglie	0,55
		3	Fusti	0,69
		4	Radici	0,94
2	Loietto	5	Parte Aerea	0,78
		6	Radici	0,92
		7	Fieno	0,87
3	Festuca	8	Parte Aerea	0,81
		9	Radici	0,86
5	Mais	13	Trinciato	0,79
6	Sorgo	14	Trinciato	0,87

Non sono stati evidenziate differenze tra le concentrazioni dei contaminanti nelle diverse **parti** di una stessa **pianta** (valutazione eseguita per girasole, loietto, medica, festuca).

Circa eventuali differenze di concentrazione di contaminanti tra le **diverse specie** vegetali coltivate, sono state evidenziate differenze solo per la molecola NP24 (PCB 153) per il girasole.

Circa le eventuali differenze di concentrazione di contaminanti tra **pianta verde e fieno** (valutate per loietto e medica+festuca) é stata evidenziata differenza significativa solo per le radici per il loietto.

In estrema sintesi sono stati evidenziati alcuni effetti significativi solo per congeneri di tipo PCB, mentre non é stato evidenziato nessun effetto significativo per quelli di tipo PCDD/PCDF.

Esiste correlazione fra concentrazione nel terreno e pianta coltivata. In particolare risulta molto forte l'associazione fra l'andamento dei congeneri nel terreno e le radici delle piante studiate.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

