



# RAPPORTI ISTISAN 20|34

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## **Produzione industriale dei dispositivi medici e decalogo del risparmio idrico**

L. Mancini, M. Marletta, L. Avellis, S. Cacioli, M. Carere, F. Chiudioni,  
P. D'Alessandro, A.M. D'Angelo, M. Figliomeni, I. Lacchetti, C. Puccinelli,  
S. Marcheggiani, P. Parnofiello, C. Romanelli, E. Volpi, F. Volpi, C. Ferrari



AMBIENTE  
E SALUTE



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

## **Produzione industriale dei dispositivi medici e decalogo del risparmio idrico**

Laura Mancini (a), Marcella Marletta (b),  
Luca Avellis (a), Silvana Caciolli (a), Mario Carere (a), Filippo Chiudioni (a),  
Paola D'Alessandro (b), Anna Maria D'Angelo (a), Mario Figliomeni (a),  
Ines Lacchetti (a), Camilla Puccinelli (a), Stefania Marcheggiani (a),  
Pina Parnofiello (b), Cristina Romanelli (c), Elisabetta Volpi (a),  
Fabrizio Volpi (a), Cinzia Ferrari (a)

*(a) Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Direzione Generale Dispositivi Medici, Ministero della Salute, Roma*

*(c) Organismo Notificato 0373, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**20/34**

Istituto Superiore di Sanità

**Produzione industriale dei dispositivi medici e decalogo del risparmio idrico.**

Laura Mancini, Marcella Marletta, Luca Avellis, Silvana Cacioli, Mario Carere, Filippo Chiudioni, Paola D'Alessandro, Anna Maria D'Angelo, Mario Figliomeni, Ines Lacchetti, Camilla Puccinelli, Stefania Marcheggiani, Pina Parnofiello, Cristina Romanelli, Elisabetta Volpi, Fabrizio Volpi, Cinzia Ferrari  
2020, 60 p. Rapporti ISTISAN 20/34

L'acqua è una sostanza indispensabile nel settore dei dispositivi medici, utilizzata sia come ingrediente che come elemento necessario alla produzione (*utility*). L'acqua permette di svolgere adeguatamente molte delle attività complementari ma fondamentali nel processo di produzione del singolo dispositivo come, ad esempio, la pulizia e il lavaggio di apparecchiature e locali di produzione, la generazione di vapore, ecc. Pertanto, diventa di centrale importanza non solo la qualità microbiologica e chimico-fisica dell'acqua utilizzata, che può influire direttamente sulla sicurezza e sulla qualità dei prodotti finiti, ma anche la sua relativa quantità. In questo contesto si è articolata l'idea progettuale che, coniugando economia ed ecologia e con il supporto dei settori coinvolti, ha condotto alla redazione condivisa di un decalogo per l'attuazione sostenibile del risparmio idrico nella produzione industriale dei dispositivi medici. Questo studio pilota può essere esportabile o applicabile in tutte le tipologie di industrie in cui l'acqua ha un ruolo di primaria importanza.

*Parole chiave:* Risparmio idrico; Produzione industriale; Dispositivi Medici

Istituto Superiore di Sanità

**Industrial production of medical devices and decalogue for water saving.**

Laura Mancini, Marcella Marletta, Luca Avellis, Silvana Cacioli, Mario Carere, Filippo Chiudioni, Paola D'Alessandro, Anna Maria D'Angelo, Mario Figliomeni, Ines Lacchetti, Camilla Puccinelli, Stefania Marcheggiani, Pina Parnofiello, Cristina Romanelli, Elisabetta Volpi, Fabrizio Volpi, Cinzia Ferrari  
2020, 60 p. Rapporti ISTISAN 20/34 (in Italian)

Water is an indispensable substance in the medical device manufacturing, both as an ingredient and as a necessary element for production (*utility*). Water allows you to adequately carry out many of the complementary but fundamental activities in the production process of the single device such as, for example, cleaning and washing of equipment and production rooms, steam generation, etc. Therefore, it becomes of central importance not only the microbiological and chemical-physical quality of the water used, which can directly affect the safety and quality of the finished products, but also its relative quantity. In this context, the design idea was articulated and, combining economy and ecology and with the support of the involved sectors, led to the shared drafting of a Decalogue for the sustainable implementation of water saving in the industrial production of medical devices. This pilot study can be exportable or applicable in all types of industries where water plays a primary role.

*Key words:* Water saving; Factory production; Medical Devices

Questo documento è stato realizzato nell'ambito dell'accordo di collaborazione tra Istituto Superiore di Sanità e Ministero della Salute "Il risparmio idrico nell'industria dei Dispositivi Medici".

Si ringraziano tutte le aziende che hanno collaborato rispondendo al questionario, consentendo i campionamenti delle acque successivamente analizzate e partecipando agli eventi comuni di discussione nei quali è stato possibile condividere il Decalogo del Risparmio idrico, oltre che i risultati ottenuti nel corso del progetto.

Si ringrazia Roberta Marcoaldi, Direttore Organismo Notificato ON0373.

Per il supporto tecnico si ringrazia Cinzia Grasso, Elio Pierdominici, Massimiliano Bugarini, Roberto Giuseppetti, Roberto Marinelli.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [laura.mancini@iss.it](mailto:laura.mancini@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

Mancini L, Marletta M, Avellis L, Cacioli S, Carere M, Chiudioni F, D'Alessandro P, D'Angelo AM, Figliomeni M, Lacchetti I, Puccinelli C, Marcheggiani S, Parnofiello P, Romanelli C, Volpi E, Volpi F, Ferrari C. *Produzione industriale dei dispositivi medici e decalogo del risparmio idrico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporti ISTISAN 20/34).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti e Manuela Zazzara*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>1. Il problema delle risorse idriche</b> .....	2
<b>2. Ricognizione della quantità di acqua utilizzata per la produzione dei dispositivi medici. Analisi dei diversi cicli di trattamento delle acque</b> .....	5
<b>3. Raccolta e analisi dei dati</b> .....	6
3.1. Reclutamento delle Aziende .....	6
3.2. Questionario informativo .....	6
3.2.1. Risultati del questionario .....	7
3.3. Campionamento .....	24
<b>4. Analisi microbiologiche</b> .....	26
4.1. Materiali e metodi .....	26
4.2. Risultati analisi microbiologiche.....	26
<b>5. Analisi ecotossicologiche</b> .....	27
5.1 Metodi ecotossicologici .....	27
5.1.1. Test acuto con il batterio <i>Vibrio fischeri</i> .....	27
5.1.2. Test acuto con il crostaceo <i>Daphnia magna</i> .....	28
5.1.3. Test cronico con l'alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	28
5.1.4. Test di fitotossicità con la pianta monocotiledone <i>Sorghum saccharatum</i> .....	29
5.1.5. Test del micronucleo con la pianta <i>Vicia faba</i> (MN test) .....	29
5.1.6. Test acuto con embrioni di pesce <i>Danio rerio</i> .....	29
5.2. Risultati delle analisi ecotossicologiche.....	30
<b>6. Decalogo del risparmio idrico nell'industria</b> .....	33
<b>Considerazioni conclusive</b> .....	35
<b>Bibliografia</b> .....	39
<b>APPENDICE A</b>	
Questionario e protocolli analitici.....	43
A1. Questionario informativo .....	45
A2. Protocolli per analisi microbiologiche .....	53
A3. Protocolli dei test ecotossicologici.....	58



## INTRODUZIONE

L'acqua è un elemento molto usato nel settore dei Dispositivi Medici (DM), sia come ingrediente, che come fluido necessario alla produzione. È impiegata in applicazioni tecnologiche (*utility*) come raffreddamento, riscaldamento, pulizie generali: in questi casi l'acqua non viene direttamente a contatto con i prodotti e la sua qualità deve essere tale da non corrodere le apparecchiature o lasciare depositi.

È altresì impiegata per applicazioni di processo come lavaggio delle attrezzature di produzione, solubilizzazione delle materie prime per la preparazione del *bulk*, reazioni chimiche, diluizione di soluzioni concentrate, produzione di vapore pulito: in questi casi l'acqua è considerata una materia prima e deve avere requisiti che dipendono dagli usi specifici a cui è destinata; come materia prima deve essere sottoposta a controlli.

Pertanto, diventa di centrale importanza non solo la qualità microbiologica e chimico-fisica dell'acqua utilizzata che può influire sulla sicurezza e sulla qualità dei prodotti finiti, ma anche la sua relativa quantità.

Proiezioni dell'UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) (WWAP, 2012) stimano che, nelle aree geografiche industrializzate come l'Europa, la domanda di acqua da parte dell'industria subirà un incremento del 150% a fronte di una riduzione, in qualità e quantità, della risorsa.

Il riuso e il riciclo della risorsa idrica nella produzione industriale, stimolati da programmi, progetti e norme, hanno la capacità di apportare benefici: economici e per gli ecosistemi che risultano meno stressati dal depauperamento della risorsa. È in questo contesto, che coniuga economia, ecologia e salute, che si è articolato lo studio sperimentale condotto con il supporto di tutte le parti coinvolte: Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Fabbricanti di Dispositivi Medici, Associazioni di categoria.

L'obiettivo finale dello studio sperimentale è stato quello di indagare lo stato dell'arte e le possibili applicazioni di risparmio, riuso e riciclo della risorsa idrica nell'ambito delle attività di produzione dei DM, al fine di redigere un decalogo condiviso con tutti gli stakeholder.

Lo studio è stato condotto in base all'accordo "Il risparmio idrico nell'industria dei Dispositivi Medici" stipulato tra il Ministero della Salute e l'ISS e finanziato dal Ministero della Salute. Lo studio è stato svolto/condotto nell'arco di 3 anni: dal 2014 al 2016.

## 1. IL PROBLEMA DELLE RISORSE IDRICHE

Nel mondo, circa il 58% dell'acqua dolce viene usato per l'agricoltura, il 15% per l'energia, il 14% per l'industria e il 13% per usi civili (Figura 1) (WWAP, 2012). Negli ultimi anni si sta assistendo ad una richiesta d'acqua sempre più crescente, causata dalla crescita della popolazione mondiale, dallo sviluppo industriale e dall'espansione dell'irrigazione in agricoltura. Parallelamente sta avvenendo un progressivo depauperamento delle fonti di acqua dolce non contaminata sia a carico dei corpi idrici superficiali che di quelli sotterranei.

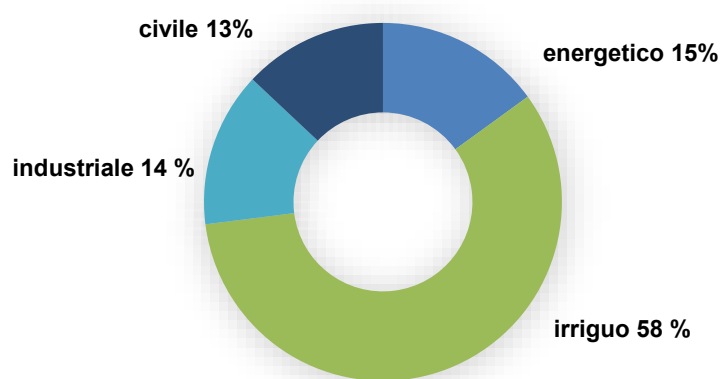


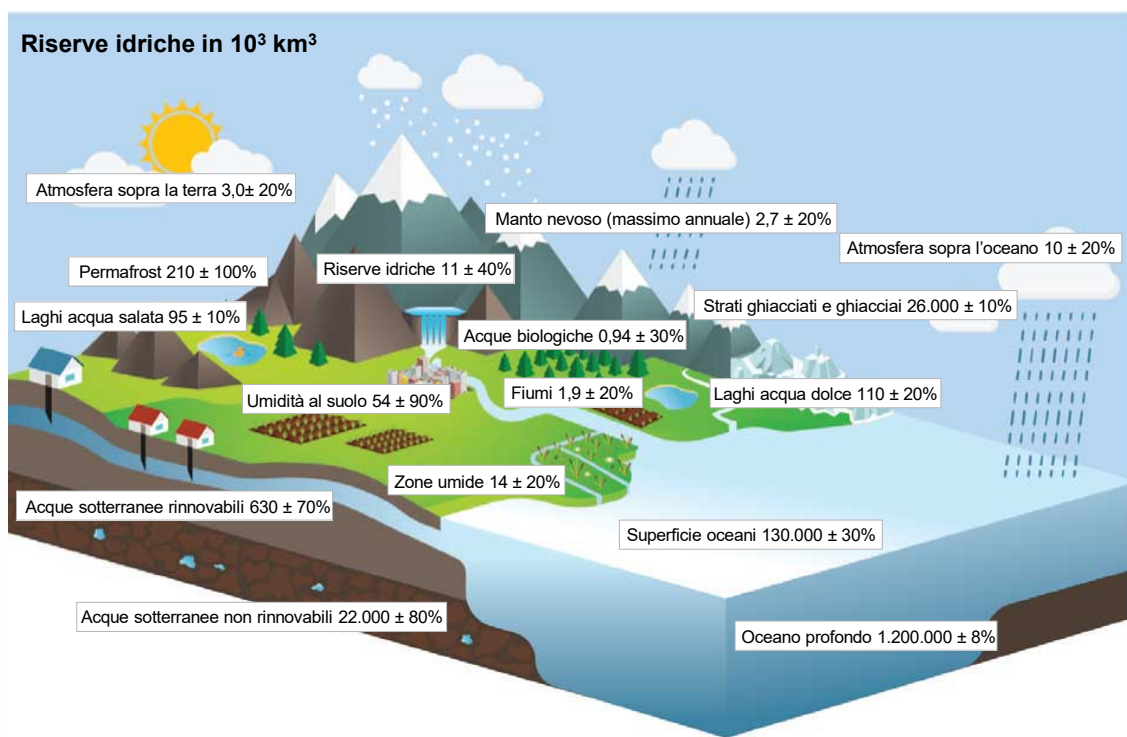
Figura 1. Percentuale di uso dell'acqua dolce disponibile nel mondo, anno 2012

I cambiamenti climatici inducono nella criosfera cambiamenti molto diffusi che stanno portando a una riduzione globale della copertura di neve e ghiaccio (Huss *et al.*, 2017) e delle riserve idriche, in generale (Figura 2). Tale diminuzione che interessa non solo la copertura nevosa e i ghiacciai ma anche il permafrost, continueranno a diminuire in quasi tutte le regioni nel corso del XXI secolo (IPCC, 2019).

Lo scioglimento accelerato dei ghiacciai avrà un effetto negativo sulle risorse idriche delle regioni montane e delle pianure adiacenti, con le regioni montane tropicali tra le più vulnerabili (Buytaert *et al.*, 2017). Sebbene lo scioglimento accelerato dei ghiacciai possa aumentare localmente e temporaneamente la portata dei fiumi, la riduzione della copertura del ghiacciaio tende a generare portate più variabili e riduzioni della portata di base a lungo termine, nonché a cambiamenti nei tempi stagionali del picco di piena.

Tali cambiamenti aggraveranno lo stress idrico, che è tra i principali problemi che dovranno affrontare molte società e il mondo nel XXI secolo. Il consumo di acqua è cresciuto di oltre il doppio rispetto all'aumento della popolazione nell'ultimo secolo (FAO, 2012). Combinato con un approvvigionamento più irregolare e incerto, aggraverà la situazione delle regioni attualmente stressate dall'acqua e genererà stress idrico nelle regioni con risorse idriche attualmente abbondanti. Sulla base delle stime riportate nei report dell'UNESCO (WWAP, 2012, 218, 2019, 2020), la domanda globale di acqua potrebbe eccedere la sua disponibilità del 40% entro il 2030. Inoltre, il consumo di acqua nel corso del secolo passato si è sestuplicata e continuerà a crescere nei prossimi decenni. Considerando questi trend, l'equa distribuzione delle risorse idriche affinché siano sufficienti per la popolazione si pone come una delle più importanti sfide del XXI secolo.





**Figura 2. Ciclo idrogeologico globale nell'Antropocene con quantificazione delle riserve idriche e identificazione dei relativi comparti (modificato da UNESCO, 2020)**

A livello nazionale non sono disponibili stime aggiornate concernenti l'utilizzo di acqua ad uso industriale. La Regione Toscana, con l'Istituto Regionale Programmazione Economica nel 2009, ha effettuato uno studio per valutare lo stato della pressione esercitata sulla risorsa acqua da parte dell'industria toscana e, in misura più approssimativa, del complesso delle attività economiche ad esclusione del settore primario:

“Le stime dei consumi di acqua delle attività industriali in Toscana restituisce un quadro complessivo che non sembrerebbe destare particolari preoccupazioni. Pur essendo presenti aree della regione le cui risorse idriche risultano particolarmente sfruttate per l'impatto che su queste ha un fitto tessuto di imprese industriali, tuttavia nel tempo tale impatto sembra essersi ridotto, complice un processo di transizione settoriale, se non di relativo 'declino industriale', che sembra implicare un minor ricorso al fattore produttivo acqua” (IRPET, 2009).

Nonostante una tendenza generale abbastanza spiccata alla contrazione del prelievo di acqua a fini produttivi, connesso in gran parte alla transizione settoriale e al ridimensionamento dei settori più tradizionali della manifattura toscana, restano numerosi contesti locali in difficoltà, passibili di evolvere in vere e proprie crisi idriche. Accanto ad un settore industriale attualmente in regresso si è sviluppato in tutto il territorio toscano, un fitto tessuto di attività terziarie il cui impatto sulla risorsa idrica è andato aumentando: si pensi ad esempio a tutte quelle legate all'attività turistica (alberghi, ristoranti, bar, impianti di balneazione), ma anche ai servizi alla persona legati allo sport e al tempo libero. Tali attività possono talvolta esercitare una pressione ulteriore in contesti locali già gravati da scarsità assoluta della risorsa e/o da conflitti nell'uso di

quest'ultima, e determinare potenzialmente l'esplosione di vere e proprie crisi idriche. Ciò anche in relazione all'evoluzione e alla disponibilità locale di acqua di qualità adeguata ai fabbisogni.

Da questo punto di vista il confronto locale tra offerta e domande di acqua per i diversi utilizzi, resta un passo in avanti fondamentale sulla strada della messa a punto di uno strumento efficace per le politiche di prevenzione e contenimento del danno ambientale.

Solo attraverso una valutazione complessiva e territorialmente puntuale delle diverse tipologie di pressione esercitate sulla risorsa potrà essere possibile individuare le aree di maggior crisi e indirizzare conseguentemente gli investimenti necessari a garantire la sostenibilità ambientale nel futuro.

## 2. RICOGNIZIONE DELLA QUANTITÀ DI ACQUA UTILIZZATA PER LA PRODUZIONE DEI DISPOSITIVI MEDICI. ANALISI DEI DIVERSI CICLI DI TRATTAMENTO DELLE ACQUE

La quantità d'acqua impiegata nell'industria dipende da numerosi fattori, tra cui la tipologia di attività e le tecnologie utilizzate. In generale, è possibile individuare, tra i tanti, tre principali usi dell'acqua: come materia prima nel processo produttivo, come utility per la termoregolazione degli *equipment* di produzione, come fluido di *cleaning* delle apparecchiature e degli ambienti. Inoltre, le acque utilizzate nei cicli produttivi industriali non sempre sono restituite all'ambiente con gli stessi livelli di qualità con cui sono state prelevate.

Tuttavia, alcune Aziende hanno avviato politiche virtuose di risparmio e riciclo dell'acqua nella logica di un bilancio sostenibile, la cui esperienza potrebbe essere di volano per espandere questo approccio strettamente collegato alla *green economy*.

In Italia il settore dei DM è caratterizzato da un tessuto industriale ricco ma composto prevalentemente da medie e piccole imprese, con una concentrazione geografica e una tendenza a sviluppare specializzazioni territoriali, basti pensare ad aree territoriali in cui sono concentrate molte realtà produttive strettamente connesse ai DM.

Il gruppo di studio ha valutato la distribuzione territoriale delle Aziende produttrici di DM, focalizzando l'attenzione sia quelle che utilizzano l'acqua come ingrediente, che quelle che la utilizzano come elemento funzionale per le fasi di produzione. Sono state valutate anche eventuali aggregazioni territoriali, es. consorzi, all'interno dello stesso settore o tipologia di DM.

Tale definizione iniziale è preziosa anche per valutare la relazione tra le eventuali scelte virtuose delle Aziende e la loro collocazione geografica, in funzione dei differenti approcci delle singole amministrazioni regionali, degli incentivi e del supporto alle singole Ditte.

L'impatto del territorio risulta, infatti, preponderante per le scelte svolte dalle Aziende sia in termini di disponibilità economica e possibilità di introdurre cambiamenti all'interno delle singole amministrazioni e di quanto l'amministrazione stessa sia "virtuosa" ovvero voglia investire sul territorio e sull'applicazione di una *green economy*, ma anche della locazione geografica di ogni singolo stabilimento. In relazione a questo ultimo aspetto era chiaro aspettarsi, ed è stato avvalorato dalle analisi condotte durante lo studio, che le Aziende che nascono in un contesto strettamente industriale tenderanno a riciclare l'acqua e a riutilizzarla al proprio interno, mentre le Aziende che sono situate sul territorio in aree agricole o comunque meno industrializzate tenderanno a riciclare e a riutilizzare l'acqua anche all'esterno del sistema produttivo per esempio per irrigazione dei propri spazi verdi o anche di quelli comunali.

Sulla base della ricognizione effettuata sono state individuate un numero congruo di Aziende che sono state invitate a partecipare al progetto.

### 3. RACCOLTA E ANALISI DEI DATI

È stata effettuata una rassegna della letteratura scientifica e della normativa nazionale e internazionale; sono stati analizzati i casi specifici di Aziende disponibili, sulla base delle eventuali politiche, già in atto o in progetto, di riciclo e riuso delle acque.

Per integrare le informazioni sugli usi idrici e per conoscere la realtà delle singole Aziende, è stato messo a punto un questionario informativo (Appendice A1). I dati raccolti sono stati utilizzati esclusivamente a fini statistici e sono stati analizzati in modo aggregato; ad ogni azienda è stato associato un ID numerico (Cod\_Azienda), tale associazione è sconosciuta al personale che ha eseguito l'elaborazione dei dati. L'ISS assicura che il personale destinato allo svolgimento delle attività di lavoro manterrà, nei confronti di qualsiasi persona non autorizzata, il segreto riguardo alle informazioni e ai documenti di cui sia a conoscenza per lo svolgimento dell'attività medesima.

Prima di renderlo pubblico per la raccolta dei dati, il questionario è stato oggetto di una validazione, al fine di verificarne la bontà come strumento di rilevazione e di individuarne l'ottimale tempistica di somministrazione. Inoltre, è stato chiesto a due esperti del settore della gestione economica dei beni ambientali di elaborare alcune domande tecniche sui costi dell'acqua e dell'energia e tre delle Aziende selezionate sono state coinvolte nel team di valutatori che ha aiutato il gruppo di studio a mettere a punto l'intero questionario, provando a compilarlo e riportando eventuali suggerimenti circa la chiarezza delle domande e la reperibilità dei dati richiesti.

Lo studio è stato svolto prima dell'entrata in vigore del nuovo Regolamento (UE) 2017/745 sui dispositivi medici (Europa, 2017), per altro ad oggi ancora posticipata fino al 26 maggio 2021, e, pertanto, la domanda "Quale classe di dispositivi medici produce" presente nel questionario è stata formulata sulla base dei criteri di classificazione relativi all'Allegato IX della Direttiva 93/42/CEE e s.m.i. (Europa, 1993).

#### 3.1. Reclutamento delle Aziende

Tra le aziende produttrici di DM, ne sono state individuate e contattate 26, distribuite sul territorio nazionale che coprono le aree di maggiore specializzazione territoriale e scelte in modo da contemplare eventuali variazioni dovute alle singole specificità del territorio. Nel corso di ogni contatto, è stato illustrato il progetto ed è stata richiesta la disponibilità ad effettuare eventuali campionamenti per lo svolgimento di analisi microbiologiche. 10 aziende su 26 hanno dato la loro disponibilità, compilando il questionario che è stato somministrato; tra queste 10, ne sono state identificate 6 rappresentative dei vari comparti idrogeografici e, tra queste 6 sono state individuate 3 aziende aventi un sistema di depurazione dedicato e 3 aziende che hanno l'immissione diretta dei reflui nel sistema della rete di scarico.

#### 3.2. Questionario informativo

Il questionario informativo/conoscitivo è costituito da un format predefinito per l'immissione dei dati dell'utente (*front-end*), che costituisce l'interfaccia alla tabella ad esso collegato, dove i dati sono archiviati e organizzati per la corretta interazione con il modulo (*back-end*). In particolare, il questionario ha preso in esame alcuni aspetti utili ad identificare l'uso dell'acqua e le eventuali politiche adottate per il risparmio e il riciclo; l'intervallo temporale in cui le aziende lo hanno

compilato è compreso tra giugno 2015 e febbraio 2016. La raccolta delle informazioni ha avuto inizio con un'analisi dei dati delle Aziende e del loro portafoglio, in termini di categorie di prodotti realizzati (DM, farmaci, cosmetici, integratori, ecc.) in modo da valutare anche l'impatto di tecnologie, di normative e di aspetti regolatori differenti, di numerosità ed estensione dei siti produttivi e della loro localizzazione geografica. In particolare, per quanto relativo ai DM sono state registrate informazioni sulla tipologia e sulla classificazione del dispositivo e sulla tipologia di impianto di trattamento di acqua presente, in modo da verificare eventuali correlazioni tra la possibilità e la volontà di riutilizzo dell'acqua, la tipologia di dispositivo realizzata e di tecnologia applicata. Parte importante delle informazioni raccolte sono legate agli aspetti economico-finanziari connessi con il consumo e con l'eventuale riciclo dell'acqua, per sviluppare un'analisi robusta da parte degli economisti del gruppo, sono stati richiesti dati relativamente ai consumi di acqua, ma anche al costo e all'impatto economico di eventuali attività di riciclo e riuso. Nel questionario trovano spazio anche informazioni inerenti all'applicazione del sistema di qualità aziendale con particolare riguardo alla gestione dei processi correlati alla produzione quali la formazione, la manutenzione e il miglioramento continuo. Il questionario è stato reso disponibile online al link <http://goo.gl/forms/8KIN9L2KdF> per facilitare la comunicazione delle Aziende e i possibili feedback.

### 3.2.1. Risultati del questionario

Di seguito sono riportate le risposte, in forma aggregata, alle domande del questionario somministrato. Questo strumento conoscitivo ha messo in evidenza la complessità del tema e la difficoltà nel reperimento delle informazioni: infatti, solo 10 aziende su 26 interpellate hanno aderito (38%) e tra queste non tutte avevano a disposizione i dati per le informazioni richieste. Tuttavia, la ricerca ha sicuramente evidenziato le Aziende virtuose che con le loro politiche di sostenibilità e piani di risparmio e riciclo dell'acqua, svolgono un ruolo di volano anche per le altre. La risposta non data alla domanda del questionario, è stata identificata con il simbolo "-". Alcuni dati numerici, al fine di renderli omogenei all'interno delle tabelle, sono stati riportati seguendo le normali regole di arrotondamento. Le regioni rappresentate dalle Aziende che hanno aderito al progetto comprendono il 40% della totalità (Figura 3).

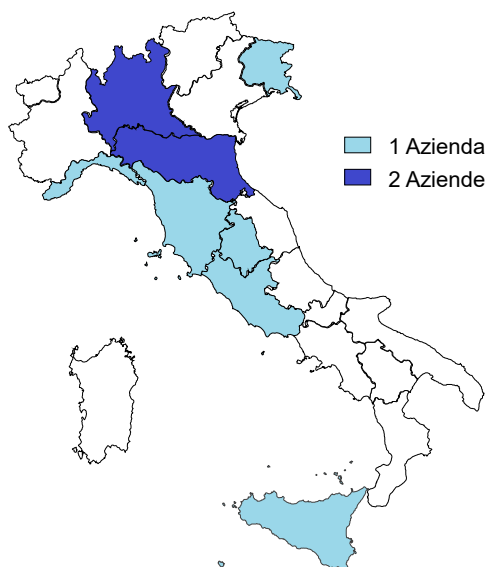


Figura 3. Aziende partecipanti all'indagine, suddivise per regione 2015-2016

## Superficie aziendale

Nella Tabella 1 sono riportate in modo sintetico le superfici delle Aziende che hanno risposto al questionario.

**Tabella 1. Superficie delle Aziende che hanno aderito al progetto 2015-2016**

Cod_Azienda	Superficie aziendale (m <sup>2</sup> )	Note
1	6.000	-
2	41.000	21.000 coperti + 20.000 scoperti
3	14.000	14.000 di superficie totale, 4.000 occupati dai reparti di produzione, 8.000 dai magazzini materie prime e prodotti finiti, 200 dai laboratori di analisi chimica e biologica e i rimanenti 1800 sono occupati dagli uffici tecnici, amministrativi, commerciali, dagli spogliatoi e dai locali servizi
4	500	-
5	2.500	-
6	9.000	-
7	5.470	-
8	1.350	-
9	30.000	-
10	-	-

## Numero di stabilimenti

Il 90% delle aziende è costituita da un unico stabilimento, mentre solo l'azienda #6 è costituita da due stabilimenti.

## Distretto idrografico

L'appartenenza ad un distretto idrografico consente di valutare, in un contesto nazionale, l'importanza della risorsa idrica. Le risposte delle aziende sono riportate nella Tabella 2. Dal confronto con quanto riportato nella Tabella 3, che descrive gli ambiti geografici e amministrativi dei distretti idrogeografici italiani, è possibile esplicitare quanto risposto, in alcuni casi, dalle aziende: ad esempio, Catania appartiene al distretto idrografico Sicilia, Milano a quello Padano, mentre Pomezia appartiene al distretto idrografico Appennino Centrale. Il 20% delle aziende non ha risposto.

**Tabella 2. Distretto idrografico su cui insistono le Aziende**

Cod_Azienda	Distretto idrografico
1	Catania
2	Bacino idrografico delle Alpi Orientali
3	Padano
4	Appennino Centrale
5	Pomezia
6	Padano
7	Milano
8	Appennino Settentrionale
9	-
10	-

Tabella 3. Ambiti geografici e amministrativi dei distretti idrografici italiani\*

Distretto idrografico	Bacino idrografico sotteso	Regione interessata	Piani di gestione
<b>Alpi orientali</b> (39.385 km <sup>2</sup> )	Adige, Alto adriatico, Lemene, Fissaro Tartaro Canalbianco, Bacini regionali del Veneto e del Friuli-Venezia Giulia, Bacino scolante nella Laguna di Venezia ex legge 29/11/1984 n. 798	Trentino PA Trento Alto Adige PA Bolzano Veneto Friuli Venezia Giulia	<a href="http://www.alpiorientali.it/">http://www.alpiorientali.it/</a>
<b>Padano</b> (71.057 km <sup>2</sup> )	Bacino del Po	Piemonte Lombardia Valle d'Aosta Liguria Emilia Romagna Toscana Veneto PA Trento	<a href="http://www.pianoacque.adbpo.it/">http://www.pianoacque.adbpo.it/</a>
<b>Appennino settentrionale</b> (39.000 km <sup>2</sup> )	Arno; Magra; Fiora; Conca Marecchia; Reno; Bacini della Liguria; Bacini della Toscana; Fiumi uniti: Montone, Ronco, Savio, Rubicone e Uso; Foglia, Arzilla, Metauro, Cesano, Misa, Esimo, Musone e altri bacini minori; Lamone; Bacini minori afferenti alla costa romagnola	Liguria Emilia Romagna Toscana Marche Umbria Lazio Piemonte	<a href="http://www.appenninosettentrionale.it/">http://www.appenninosettentrionale.it/</a>
<b>Serchio</b> (1.600 km <sup>2</sup> )	Bacino del Serchio	Toscana	<a href="http://www.autorita.bacinoserchio.it/">http://www.autorita.bacinoserchio.it/</a>
<b>Appennino centrale</b> (35.800 km <sup>2</sup> )	Tevere, Tronto; Sangro; Bacini dell'Abruzzo; Bacini del Lazio; Potenza, Chienti, Tenna, Ete, Aso, Menocchia, Tesino e bacini minori della Marche	Abruzzo Lazio Marche Emilia Romagna Toscana Molise Umbria	<a href="http://www.abtevere.it/?q=node/718">http://www.abtevere.it/?q=node/718</a>
<b>Appennino meridionale</b> (68.200 km <sup>2</sup> )	Liri Garigliano; Volturno; Sele; Sinni e Noce; Bradano; Saccione, Fortore e Biferno; Ofanto; Lao; Trigno; Bacini della Campania; Bacini della Puglia; Bacini della Basilicata; Bacini della Calabria; Bacini del Molise	Basilicata Campania Calabria Puglia Lazio Abruzzo Molise	<a href="https://www.distrettoappenninomeridionale.it/">https://www.distrettoappenninomeridionale.it/</a>
<b>Sardegna</b> (24.000 km <sup>2</sup> )	Bacini della Sardegna	Sardegna	<a href="http://www.regione.sardegna.it/index.php?xsl=509&amp;s=1&amp;v=9&amp;c=6697&amp;tb=6695&amp;st=7&amp;nodesc=2">http://www.regione.sardegna.it/index.php?xsl=509&amp;s=1&amp;v=9&amp;c=6697&amp;tb=6695&amp;st=7&amp;nodesc=2</a>
<b>Sicilia</b> (26.000 km <sup>2</sup> )	Bacini della Sicilia	Sicilia	<a href="http://www.osservatorioacque.it/?cmd=article&amp;id=71&amp;tpl=default">http://www.osservatorioacque.it/?cmd=article&amp;id=71&amp;tpl=default</a>

PA: Provincia Autonoma

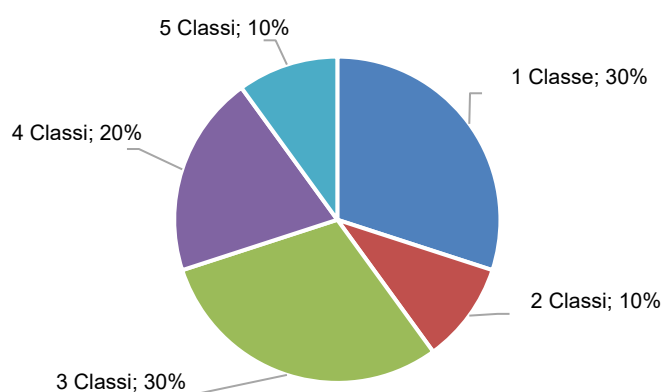
\*Tabella realizzata in base alle informazioni presenti nei portali web delle Autorità di Bacino Distrettuali.

### Quale classe di dispositivo medico realizza?

Tutte le Aziende hanno risposto. Nella Tabella 4 è riportato il numero delle aziende che producono una determinata classe di DM, mentre in Figura 4, viene rappresentata la percentuale delle aziende che producono una o più di una classe di DM: si può notare che il 30% delle aziende interpellate produce una sola classe di DM, mentre solo una Azienda produce tutte e 5 le differenti classi di DM.

**Tabella 4. Classe di dispositivi medici e numero di Aziende produttrici 2015-2016**

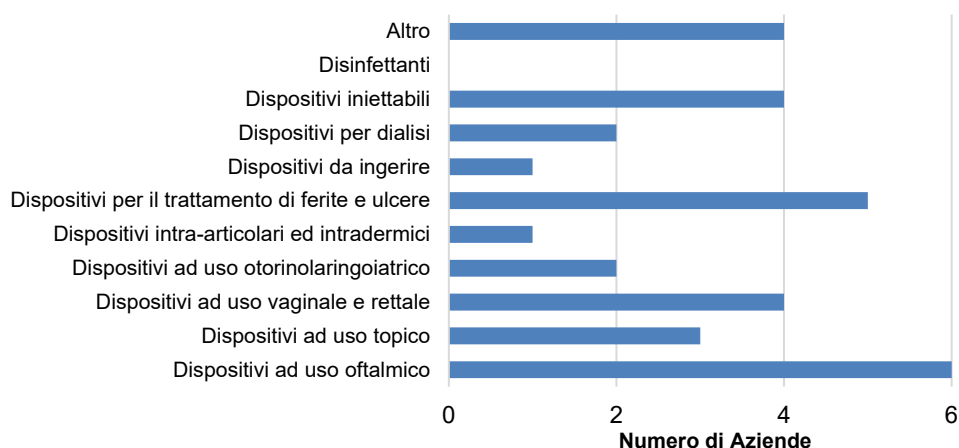
Classe di DM	N. Aziende
Classe I s (sterile) (basso rischio)	4
Classe I m (di misura) (basso rischio)	5
Classe II a (medio rischio)	7
Classe II b (rischio medio/alto)	6
Classe III (alto rischio)	5



**Figura 4. Aziende che producono una o più classi di dispositivi medici 2015-2016**

### Quale tipologia di dispositivo medico realizza?

A questa domanda hanno risposto tutte le Aziende. In Figura 5 è riportata la tipologia dei DM, realizzati dalle Aziende che hanno aderito al progetto; alcune di queste ne producono più di una. Quattro di esse producono dispositivi che non rappresentati nell'elenco.



**Figura 5. Tipologia dei dispositivi medici e numero di aziende produttrici 2015-2016**



### Realizza cosmetici?

Il 40% delle Aziende realizza anche cosmetici, come riportato in Figura 6; solo una di esse (10%) non ha risposto a questa domanda.

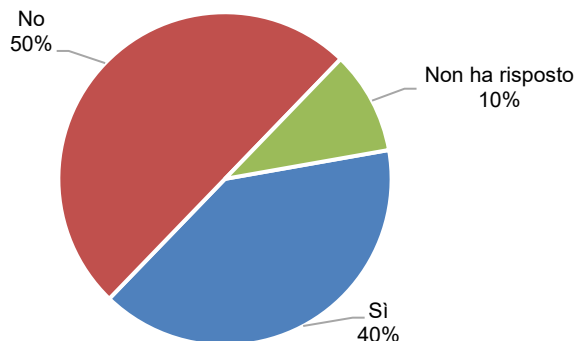


Figura 6. Aziende che realizzano anche cosmetici 2015-2016

### Realizza integratori?

Tutte le Aziende hanno risposto, il 40 % di quelle che hanno aderito al progetto realizza anche integratori.

### Realizza farmaci?

A questa domanda hanno risposto tutte le Aziende. Il 60% delle Aziende produce anche farmaci.

### Realizza biocidi?

Tutte le Aziende hanno risposto al quesito e nessuna di esse produce biocidi. In Figura 7 sono riportate in grafico le tipologie di prodotti fabbricati dalle aziende produttrici di dispositivi medici e menzionati nelle precedenti 4 domande.

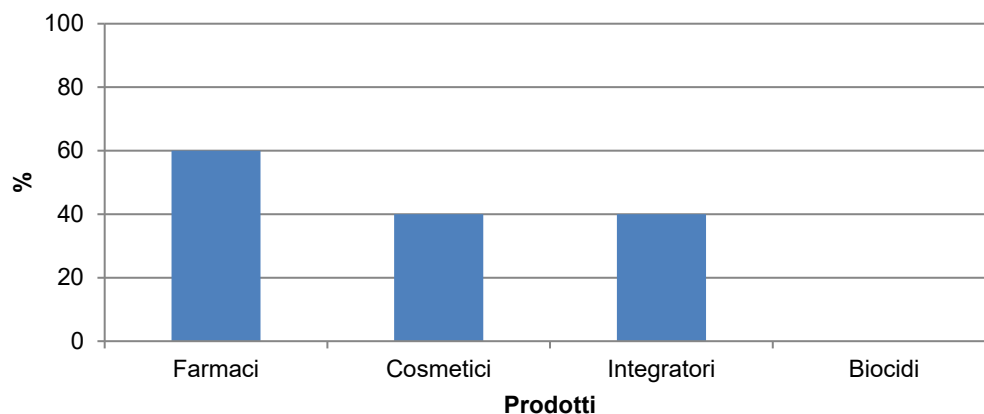
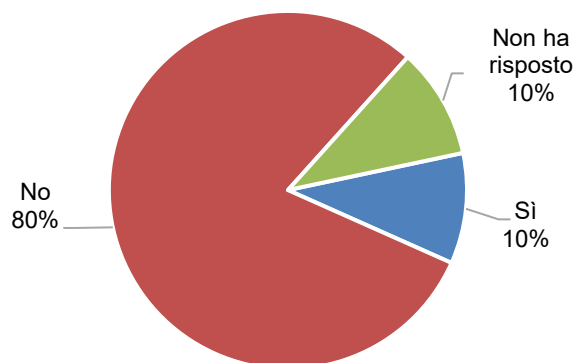


Figura 7. Rappresentazione riassuntiva (in %) dei prodotti realizzati dalle Aziende 2015-2016

## Esiste una politica aziendale per la gestione sostenibile dell'acqua?

Per la maggior parte delle aziende non esiste una politica aziendale per la gestione sostenibile della risorsa idrica, e solo una risponde in modo affermativo; non risponde a questa domanda una sola azienda (Figura 8).



**Figura 8. Percentuale di Aziende che adottano una politica aziendale per la gestione sostenibile dell'acqua 2015-2016**

### Se sì, quale?

A questa domanda ha risposto una sola Azienda e di seguito ne viene riportata la risposta: "L'acqua è vitale per lo sviluppo umano e comunitario. Questa Azienda si adopera al fine di limitare il proprio impatto sui bacini idrografici e promuovere attività di gestione delle acque nelle comunità in cui opera. Faremo in modo che l'utilizzo di acqua da parte della Società rispetti le esigenze delle nostre comunità. Riteniamo che il settore abbia un ruolo essenziale nella ricerca di soluzioni sostenibili per le attuali sfide idriche. Riconosciamo che lo sviluppo umano e i cambiamenti climatici influenzeranno profondamente la disponibilità di acqua e ci adopereremo per ridurre i mutamenti e adattarci agli stessi. L'effetto diretto per quanto riguarda le acque delle operazioni deriva principalmente dall'utilizzo di acqua nella produzione di integratori alimentari e cosmetici. Gli effetti indiretti derivano dall'utilizzo di acqua per il raffreddamento degli impianti di trattamento dell'aria.

In conformità alla politica ambientale applicata, la ditta si impegna a:

- programmare le lavorazioni in maniera tale da ridurre al minimo i lavaggi delle macchine/ambienti;
- verificare costantemente le potenzialità di riutilizzo dell'acqua utilizzata nei processi e negli impianti;
- ridurre al minimo l'effetto delle operazioni, diminuendo l'utilizzo di acqua e garantendo che le acque di scolo siano completamente trattate a livelli che sostengano la vita acquatica;
- valutare le future disponibilità di acqua e ridurre i rischi ambientali e sociali connessi all'utilizzo di acqua da parte della Società;
- contribuire allo sviluppo dei principi e delle politiche in materia idrica, in collaborazione con le principali parti interessate;
- collaborare con le organizzazioni e le iniziative per la gestione delle acque;
- condividere e promuovere le prassi di gestione delle acque. Riferiamo in maniera esauriente e trasparente gli effetti e le attività della Società in materia idrica, sotto la guida delle

principali parti interessate. In qualità di Amministratore Delegato sono impegnato nell'ambito della presente Politica in materia di gestione delle acque che è di proprietà ed è approvata dal Consiglio di Amministrazione. La responsabilità per il successo dell'attuazione di tale programma è di tutti i dipendenti a ogni livello e funzione dell'organizzazione.

### Che tipo di acqua viene utilizzata in ingresso al sistema di trattamento?

A questa domanda hanno risposto tutte le Aziende, la tipologia di acqua utilizzata è principalmente quella proveniente dalla rete idrica, (Tabella 5). Nessuna Azienda attinge da acque superficiali.

**Tabella 5. Tipo di acqua utilizzata in ingresso al sistema di trattamento 2015-2016**

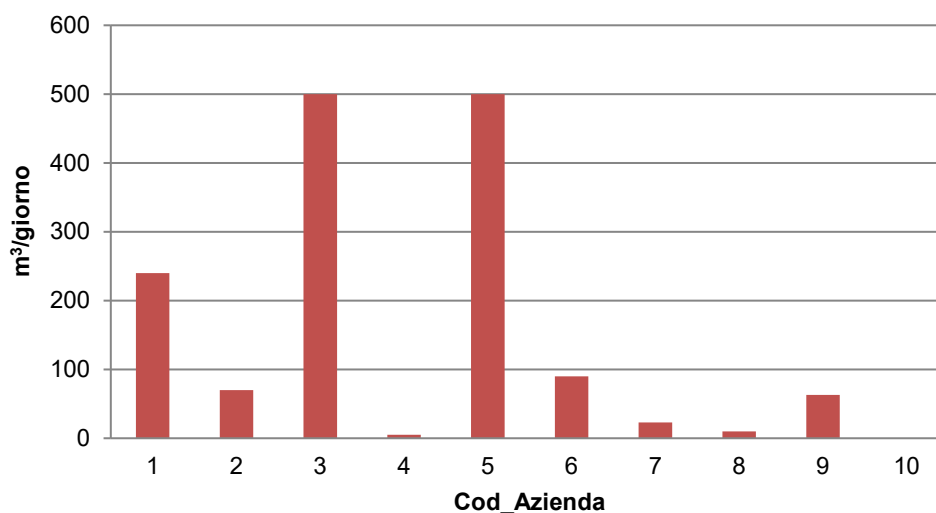
Tipo di acqua	N. Aziende
Di rete	8
Di pozzo	1
Da fonte naturale superficiale (Lago)	0
Da fonte naturale superficiale (Fiume)	0
Di rete + pozzo	1

### Qual è il sistema di tariffazione dell'acqua?

Tutte le Aziende hanno risposto che usano il sistema di tariffazione a consumo.

### Quanta acqua viene prelevata al giorno?

In Figura 9 sono riportate le quantità di acqua prelevata dalle aziende, espressa in m<sup>3</sup>/giorno ed è possibile apprezzare la variabilità del dato, anche in funzione della grandezza delle aziende. Solo una azienda (10%) non ha risposto al quesito.



**Figura 9. Quantità di acqua prelevata giornalmente dalle Aziende 2015-2016**

### Quanta acqua viene prelevata in un anno?

Questo dato è disponibile per la maggior parte delle Aziende e i risultati sono riportati nella Tabella 6. Anche in questo caso, una azienda non ha risposto (10%).

**Tabella 6. Acqua prelevata annualmente dalle Aziende espresso in metri cubi (m<sup>3</sup>/anno) 2015-2016**

Cod_Azienda	m <sup>3</sup> /anno
1	74.000
2	26.000
3	100.000
4	1.374
5	112
6	27.000
7	8.500
8	3.000
9	23.000
10	-

### Qual è il costo complessivo dell'acqua alla data di compilazione del questionario?

Questa informazione non è disponibile per tutte le Aziende che hanno risposto al quesito precedente (Tabella 7), così come per i quesiti successivi.

2 aziende (20%) non hanno risposto al quesito, mentre l'Azienda #5 riporta che questo dato è non disponibile (ND).

**Tabella 7. Costo complessivo annuale dell'acqua per le Aziende in Euro (€) 2015-2016**

Cod_Azienda	Costo (€/anno)
1	6.000
2	47.000
3	-
4	11.690
5	ND
6	38.000
7	6.521
8	3.650
9	44.000
10	6.000

### Qual è il costo di approvvigionamento dell'acqua alla data di compilazione del questionario?

Le risposte sono riportate in Tabella 8. 4 aziende (40%) non hanno risposto; per l'azienda #5 tale dato è non disponibile (ND), mentre due aziende hanno riportato il valore "0".

**Tabella 8. Costo di approvvigionamento dell'acqua per le Aziende in Euro 2015-2016**

Cod_Azienda	Costo (€)
1	0,00
2	-
3	4.000,00
4	-
5	ND
6	0,00
7	4.890,00
8	-
9	44.000,00
10	-

### Quali sono i consumi e i costi energetici annuali complessivi per l'elettricità?

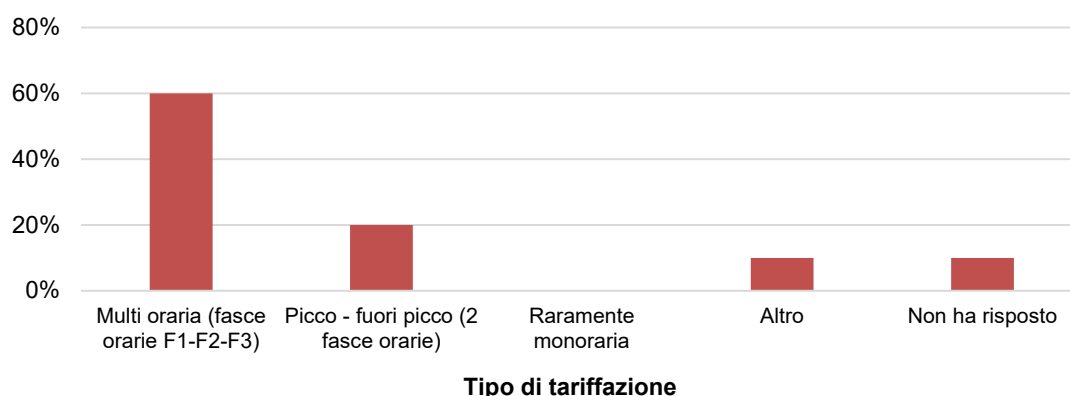
A questo quesito hanno risposto 7 aziende, (70%), (Tabella 9); per due di esse il dato è non disponibile (ND) oppure non rilevato (NR), per uno od entrambi valori.

**Tabella 9. Consumi e costi energetici complessivi annuali per l'elettricità. I consumi sono espressi in Tonnellate Equivalenti di Petrolio (TEP) 2015-2016**

Cod_Azienda	Consumi (TEP)	Costo (€/anno)
1	ND	ND
2	1.310	1.000.000,00
3	6.000	450.000,00
4	-	-
5	ND	ND
6	-	-
7	150	125.000,00
8	NR	53.062,00
9	92	176.110,00
10	-	-

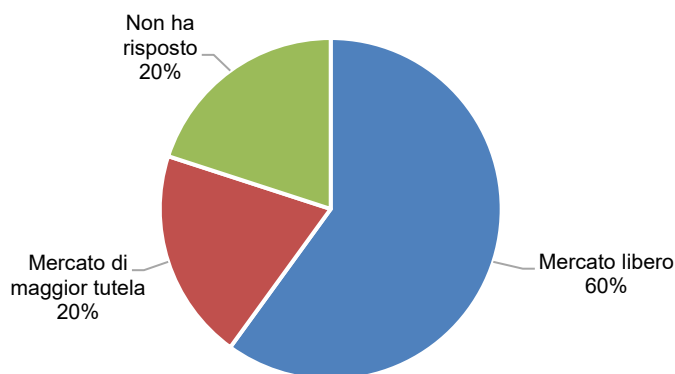
### Qual è il sistema di tariffazione dell'energia?

I risultati mostrano che la maggior parte delle aziende preferisce adottare una tariffazione multi oraria (Figura 10). A questo quesito una sola azienda (10%) non ha risposto, mentre per l'Azienda #5 tale valore è non disponibile (ND), ed è stato riportato nell'istogramma "Altro".

**Figura 10. Tariffazione per l'energia elettrica acquistata dalle Aziende 2015-2016**

### L'approvvigionamento è su:

Il quesito prevedeva solo due risposte: mercato libero oppure mercato tutelato. Il 60 % delle Aziende predilige l'approvvigionamento dell'energia elettrica sul libero mercato (Figura 11). Due Aziende non hanno risposto (20%).



**Figura 11. Rappresentazione percentuale del tipo di contratto energetico adottato dalle Aziende 2015-2016**

### Se l'approvvigionamento è sul mercato tutelato, il tipo di servizio è:

Una sola Azienda (10%) ha risposto, indicando che adotta il servizio di maggior tutela.

### Quali sono i consumi e i costi energetici complessivi per il combustibile?

I risultati sono riportati nella Tabella 10. Alcune aziende hanno riportato il costo ma non il consumo; 3 aziende (30%) non hanno indicato alcun valore, mentre per l'azienda #1 il dato è non disponibile (ND).

**Tabella 10. Consumi e costi complessivi annuali per il combustibile. I consumi sono espressi in Tonnellate Equivalenti di Petrolio (TEP) o in metri cubi di gas (m<sup>3</sup>), i costi in Euro (€). 2015-2016**

Cod_Azienda	Consumi (TEP)	Consumi (m <sup>3</sup> /anno)	Costo (€/anno)
1	ND		ND
2	534		205.000,00
3	350		130.000,00
4	-		-
5	-		-
6	-		690,00
7	327		165.000,00
8		44	41.880,00
9	138		84.700,00
10	-		-

### Quali sono i consumi e i costi energetici complessivi per i carburanti?

I risultati sono riportati nella Tabella 11. Alcune aziende hanno riportato il costo ma non il consumo; 3 aziende (30%) non hanno risposto a questo quesito, mentre per l'azienda #1 tale valore è non disponibile (ND). Due aziende hanno risposto con il valore "0".

**Tabella 11. Consumi e costi complessivi annuali per i carburanti. I consumi sono espressi in Tonnellate Equivalenti di Petrolio (TEP), i costi in Euro (€/anno). 2015-2016**

Cod_Azienda	Consumi (TEP)	Costo (€/anno)
1	ND	ND
2	0,4	500,00
3	0	0
4	-	-
5	-	-
6	-	180,00
7	0	0
8	-	14.684,00
9	15.732	20.393.300,00
10	-	-

### In che percentuale incide il costo dell'acqua sul bilancio dell'Azienda?

I risultati sono riportati nella Tabella 12. 3 Aziende (30%) non hanno risposto a questo quesito, mentre per l'azienda #1 il dato è non disponibile (ND).

**Tabella 12. Incidenza percentuale del costo dell'acqua sul fatturato dell'Azienda 2015-2016**

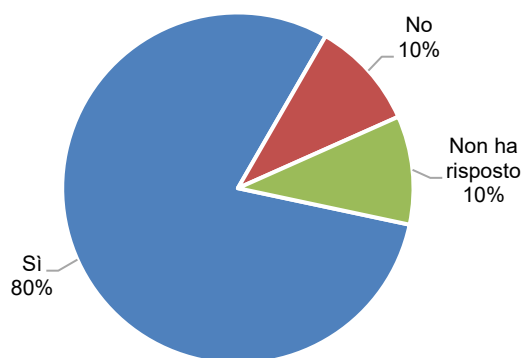
Cod_Azienda	Percentuale
1	ND
2	0,08
3	0,25
4	0,05
5	-
6	0,04
7	<0,10
8	-
9	0,16
10	-

### Vi sono dei costi energetici associati al ciclo idrico aziendale?

I risultati, riportati in Figura 12, evidenziano l'effettiva esistenza dei costi per la quasi totalità delle aziende; solo una non ha risposto (10%).

### Se sì, quanta parte dei costi energetici è dovuta all'impiego dell'acqua nei processi industriali?

I risultati sono riportati nella Tabella 13. Alcune aziende hanno riportato i consumi, oltre la percentuale di incidenza dei costi energetici. 4 aziende (40%) non hanno risposto a questo quesito, mentre per l'azienda #1 tale valore è non disponibile (ND) e per l'Azienda #8 il dato è non rilevato (NR).



**Figura 12. Rappresentazione grafica dell'esistenza di costi energetici associati al ciclo idrico aziendale 2015-2016**

**Tabella 13. Parte dei costi energetici dovuta all'impiego dell'acqua. I consumi sono espressi in Tonnellate Equivalenti di Petrolio (TEP). 2015-2016**

Cod_Azienda	Consumi (TEP)	Percentuale
1	ND	ND
2	-	-
3	10	-
4	-	0,02
5	-	-
6	-	5
7	-	-
8	NR	NR
9	82	64
10	-	-

**Sono state avviate azioni volte alla riduzione del consumo energetico connesso con l'uso di acqua?**

I risultati sono riportati nella Tabella 14; una sola azienda ha risposto di non avere implementato alcuna azione; 4 aziende (40%) non hanno risposto.

**Tabella 14. Azioni volte alla riduzione del consumo energetico connesso con l'uso di acqua 2015-2016**

Azioni	N. Aziende
Impianti rinnovabili (cogenerazione, ecc.)	0
Efficientamento impianti (ottimizzazione e riduzione sprechi)	2
Riutilizzo idrico (es per raffreddamento impianti)	3
Nessuno	1
Non ha risposto	4



### Quali sono i vantaggi e i risparmi conseguiti?

Solo l'Azienda #2 ha risposto a questa domanda, dichiarando che il risparmio annuo è di Euro 12.000,00; per due aziende tale dato non è disponibile (ND), per una non è applicabile (NA); per l'azienda #8 tale dato, alla data di compilazione del questionario, non è quantificabile.

### Personale dedicato alle attività di gestione degli impianti (dato annuo) e costi

I risultati sono riportati nella Tabella 15. Alcune aziende non hanno riportato i costi di gestione, oppure sono non disponibili. 3 aziende (30%) non hanno risposto a questo quesito.

**Tabella 15. Personale dedicato alle attività di gestione annuale degli impianti e costi in Euro (€/anno) 2015-2016**

Cod_Azienda	N. Persone	Costo (€/anno)
1	3	ND
2	2	40.000,00
3	0,5	25.000,00
4	-	-
5	2	-
6	3	20.000,00
7	3	-
8	0,5	20.000,00
9	-	-
10	-	-

### Qual è il costo di manutenzione ordinaria degli impianti?

I risultati sono riportati nella Tabella 16. 3 aziende (30%) non hanno risposto a questo quesito, mentre per l'azienda #5 il dato è non disponibile (ND).

**Tabella 16. Costo di manutenzione ordinaria annuale degli impianti in €/anno. 2015-2016**

Cod_Azienda	Costo (€/anno)
1	260.000,00
2	140.000,00
3	10.000,00
4	-
5	ND
6	60.000,00
7	10.000,00
8	33.000,00
9	-
10	-

### Qual è il costo di manutenzione straordinaria degli impianti?

In Tabella 17 sono riportate le risposte al quesito.

L'Azienda #7 ha dichiarato di non aver sostenuto costi per la manutenzione straordinaria; 4 aziende (40%) non hanno risposto.

**Tabella 17. Costo di manutenzione straordinaria annuale degli impianti in Euro (€/anno) 2015-2016**

Cod_Azienda	Costo (€/anno)
1	30.000,00
2	100.000,00
3	10.000,00
4	-
5	-
6	20.000,00
7	Nessuno
8	20.000,00
9	-
10	-

**Quante manutenzioni straordinarie ha subito l'Azienda negli ultimi 3 anni?**

I risultati sono riportati nella Tabella 18 e sono, come si può vedere, molto variabili anche in funzione della complessità strutturale degli impianti. Il range dei valori è compreso tra “Quasi tutti i giorni” per l'Azienda #6 a “Nessuno” per l'azienda #7. 3 aziende (30%) non hanno risposto; per due il dato è non disponibile (ND) mentre l'azienda #2 definisce il quesito non applicabile (NA).

**Tabella 18. Numero di manutenzioni straordinarie agli impianti implementate negli ultimi 3 anni 2015-2016**

Cod_Azienda	N. di manutenzioni
1	ND
2	NA
3	2
4	-
5	ND
6	Quasi tutti i giorni
7	Nessuno
8	2
9	-
10	-

**Quale è la stima del costo dei trattamenti?**

I risultati sono riportati nella Tabella 19. Le aziende hanno riportato il costo annuale complessivo e alcune hanno aggiunto anche il costo per metro cubo (€/m<sup>3</sup>) di materiale. 4 aziende (40%) non hanno risposto, mentre per l'azienda #8 il dato è non disponibile (ND).

**Tabella 19. Stima annuale del costo dei trattamenti in Euro (€/anno) e in Euro per metro cubo di materiale (€/m<sup>3</sup>) 2015-2016**

Cod_Azienda	Costo (€/anno)	€/m <sup>3</sup>
1	15.000,00	-
2	14.500,00	-
3	30.000,00	-
4	-	-
5	-	-
6	100.000,00	4,00
7	-	-
8	-	-
9	50.000,00	3,50
10	-	-

### Quali sono i costi associati alla fase di scarico/smaltimento?

I risultati sono riportati nella Tabella 20. La maggior parte delle aziende ha riportato il costo annuale complessivo e alcune hanno aggiunto anche il costo per metro cubo (€/m<sup>3</sup>). L'Azienda #7 ha riferito il valore ad ogni m<sup>3</sup> di acqua prelevata, mentre l'Azienda #9 ha riferito il valore ad ogni m<sup>3</sup> di reflui smaltiti. 3 aziende (30%) non hanno risposto a questo quesito.

**Tabella 20. Costi annuali associati alla fase di scarico/smaltimento in €/m<sup>3</sup> 2015-2016**

Cod_Azienda	Costo (€/anno)	€/m <sup>3</sup>
1	35.000,00	-
2	140.000,00	-
3	25.000,00	-
4	-	-
5	-	-
6	30.000,00	-
7	-	0,28*
8	5.000,00	-
9	41.000,00	3,41
10	-	-

\*il dato è riferito a 1 m<sup>3</sup> di acqua prelevata.

### Quali trattamenti vengono eseguiti sull'acqua all'interno dei processi industriali?

Le tipologie di trattamenti e il numero di aziende che le implementa, sono riportate nella Tabella 21; 9 Aziende eseguono un pretrattamento migliorativo della qualità chimico-fisica prima di utilizzare l'acqua; in 9 Aziende è prodotta acqua depurata tramite diversi processi e 5 Aziende producono acqua per preparazioni iniettabili (*Water for Injection, WFI*). Solo una Azienda (10%) non ha risposto.

**Tabella 21. Tipo di trattamenti eseguiti dalle aziende sull'acqua all'interno dei processi industriali 2015-2016**

Trattamenti	N. Aziende
Potabilizzazione	1
Pretrattamento (addolcimento, dechlorazione, filtrazione, ecc.)	9
Trattamento per acqua depurata (osmosi inversa, ultrafiltrazione, ecc.)	9
Trattamento per acqua per preparazioni iniettabili	5
Non risponde	1

### Come è usata/distribuita l'acqua?

I risultati sono riportati nella Tabella 22. Le Aziende hanno risposto riportando la percentuale quantità di acqua utilizzata nei vari processi; l'Azienda #2 ha risposto esprimendo la quantità di acqua utilizzata in metri cubi al giorno (m<sup>3</sup>/giorno); l'Azienda #8 ha indicato solamente la tipologia di uso, ma non le percentuali. 2 aziende (20%) non hanno risposto a questo quesito.

**Tabella 22. Uso dell'acqua per i diversi processi 2015-2016**

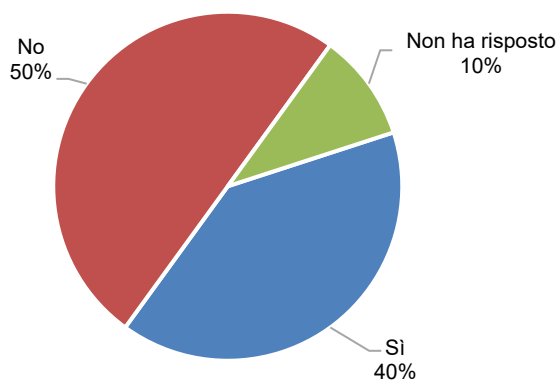
Uso	Cod_Azienda									
	1	2*	3	4	5	6	7	8**	9	10
Civile	30			5			15	x	18	
Produzione	70		50	95		10	0,5	x	74	
Purificazione			30							
Raffreddamento		5	10							4
Riscaldamento		16								
Produzione Vapore		4	5							
Lavaggio						90		x		
Irrigazione							5		3	
Pulizia e sanitizzazione							5			
Acqua scaricata per lavaggi e processi di depurazione							34,5			
Industriale (vapore, centrale termica, umidificazioni e torre evaporativa)		11					40			
Osmosi		40								
Altro			5							

\*valori espressi in m<sup>3</sup>/giorno

\*\* L'azienda ha indicato solo la tipologia

### Esiste un programma di riutilizzo dell'acqua all'interno dell'Azienda?

La maggior parte delle aziende (50%) non ha in essere un programma per il riutilizzo della risorsa idrica. I risultati, per questa domanda, sono riportati in Figura 13. Una sola azienda non ha risposto (10%).



**Figura 13. Rappresentazione grafica del riutilizzo dell'acqua all'interno dell'Azienda 2015-2016**

**Se sì, per quale fase?**

4 Aziende (40%) hanno risposto che l'acqua è riutilizzata, all'interno del proprio stabilimento, per il raffreddamento delle apparecchiature; due di esse la utilizzano anche per il lavaggio. Le altre 6 Aziende (60%) non hanno risposto al quesito.

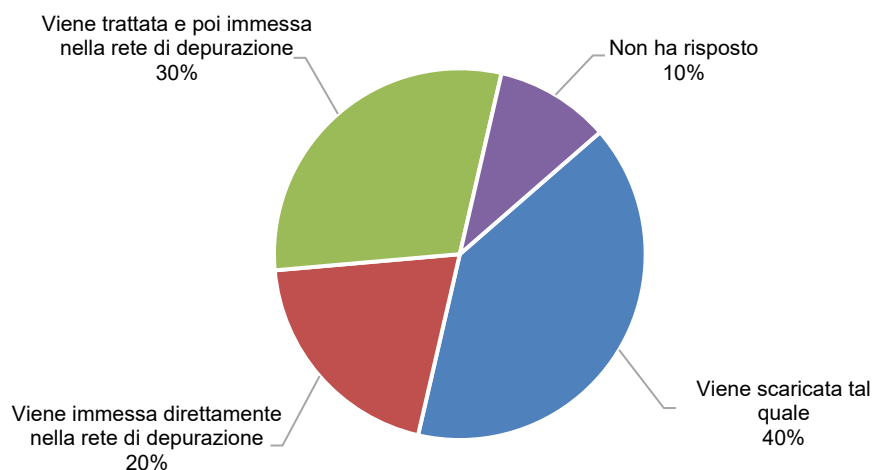
**Esiste un programma di riciclo dell'acqua di scarico?**

Solo una azienda (10%) ha risposto di avere implementato un programma di riciclo per le acque reflue; le altre 7 (70%) hanno risposto di non averne uno. 2 Aziende (20%) non hanno risposto.

**Se no, qual è il destino dell'acqua di scarico?**

La maggior parte delle Aziende (40%) scarica l'acqua tal quale, senza sottoporla ad alcun trattamento. I risultati sono riportati in Figura 14.

Il 30% delle aziende (compreso l'azienda che ha risposto sì al quesito precedente), invece, sottopone le acque reflue ad un trattamento prima di immetterle nella rete di depurazione. Il 20% non tratta le acque reflue e le immette direttamente nella rete di depurazione. Solo una azienda (10%) non ha risposto.



**Figura 14. Rappresentazione percentuale del destino dell'acqua di scarico descritto dalle Aziende 2015-2016**

**Se sì, per cosa è riciclata l'acqua?**

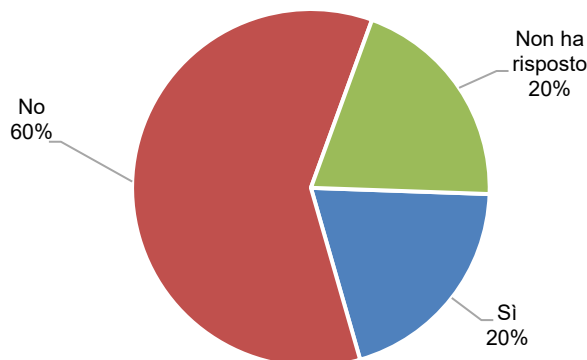
A questa domanda ha risposto solo l'Azienda #2 che dichiara di riciclare l'acqua per il depuratore.

**Se sì, in che percentuale?**

La stessa Azienda #2 ha risposto che l'acqua di scarico viene riciclata nell'ordine del 7%.

### Sono previste nell'Azienda altre soluzioni per il risparmio dell'acqua?

I risultati sono riportati in Figura 15 e mostrano che la maggior parte delle aziende non prevede altre soluzioni per il risparmio idrico, mentre solo il 20% di esse ne ha trovate. 2 aziende (20%) non hanno risposto.



**Figura 15. Rappresentazione grafica della percentuale delle risposte per la scelta di altre soluzioni per il risparmio dell'acqua 2015-2016**

#### Se sì, quali?

A questa domanda hanno risposto solo due aziende: l'Azienda #2 riporta che la soluzione messa in atto consiste in una migliore ottimizzazione della programmazione delle campagne di produzione, al fine di minimizzare i lavaggi intra-campagna delle attrezzature e macchine. L'azienda #8 dichiara di riutilizzare l'acqua nei WC.

In generale si evidenzia la complessità del tema e la difficoltà a reperire informazione: infatti solo una parte delle Aziende coinvolte ha aderito e tra queste non tutte avevano dati disponibili per le informazioni richieste.

Tuttavia, la ricerca ha sicuramente evidenziato le Aziende virtuose che svolgono un ruolo di volano anche per le altre con politiche di sostenibilità e piani di risparmio e riciclo dell'acqua.

### 3.3. Campionamento

I requisiti fondamentali di un corretto campionamento sono la rappresentatività e le modalità di prelievo. Il prelievo deve essere eseguito da personale addestrato. Sul campione va posta un'etichetta riportante il codice identificativo dell'azienda, il punto di prelievo e la data. I contenitori devono essere sterili e a chiusura ermetica, il campione va inoltre imballato per evitare rotture e sversamenti e trasportato in condizioni refrigerate, per garantire la validità dell'analisi. Inoltre, campione deve essere accompagnato dal relativo verbale di prelievo, correttamente compilato. Per effettuare un campionamento significativo va valutata la matrice su cui si interviene. Le matrici liquide omogenee non richiedono particolari procedure, se non l'accurata agitazione del prodotto prima del prelievo.

Pertanto, una corretta procedura prevede:

- un campionamento rappresentativo (per numero di campioni elementari, numero dei punti di prelievo, grandezza del campione globale e del campione finale);

- un'accurata omogeneizzazione del campione globale;
- una quantità di campione adeguata all'analisi: campioni insufficienti non sono rappresentativi, mentre quantitativi elevati creano eccessive difficoltà al momento della miscelazione per il prelievo;
- la conservazione del campione prima dell'analisi in luogo fresco e asciutto, salvo diversamente specificato.

Il prelievo e la formazione dei campioni devono avvenire con tutta la rapidità possibile prendendo le precauzioni necessarie per evitare qualsiasi alterazione o contaminazione del prodotto; le attrezzature devono essere pulite, disinfettate e, in caso di analisi microbiologiche, sterili.

Le attività di campionamento a partire dalla pianificazione in termini di frequenza dalla scelta delle stazioni, ai prelievi di acqua, alla conservazione e al trasporto dei campioni sono state effettuate seguendo le procedure standard (UNI EN ISO 5667-1:2007; UNI EN ISO 5667-3:2013; UNI EN ISO 5667-16:2001; UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005; APAT, 2003a).

I campioni sono stati accettati dall'allora Reparto Qualità Ambientale e Ittiocoltura (ora Reparto Ecosistemi e Salute) del Dipartimento Ambiente e Salute dell'ISS, solo se conformi ai requisiti richiesti: trasporto a temperatura controllata ( $0\div 5^{\circ}\text{C}$ ) entro 24 ore dal prelievo; contenitore chiuso e integro e un codice e/o una descrizione che lo identifichi con data di prelievo e con una codifica numerica per evitare il riferimento diretto con le Aziende.

### **3.3.1. Modalità di campionamento e trasporto dei campioni**

La corretta esecuzione del campionamento e le modalità di trasporto dei campioni sono fattori determinanti e possono influenzare il risultato analitico. Al momento del campionamento è necessario aver considerato con attenzione i volumi di acqua da prelevare nel nostro studio sono stati prelevati 5 litri di acqua distribuiti in 5 recipienti.

Ogni aliquota di 1 litro è stata collocata in recipienti di materiale inerte, e protetta da eventuali contaminazioni secondarie, da eventuali danni causati dal trasporto e possibilmente dai raggi solari. La confezione effettuata assicura la conservabilità del campione anche in laboratorio.

Per le analisi microbiologiche sono stati utilizzati strumenti e contenitori sterili (contenitore sterile con chiusura a vite). Il trasporto è avvenuto in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra  $+4$  e  $+10^{\circ}\text{C}$ . Durante il trasporto le bottiglie sono state collocate nel contenitore in modo da impedire il loro rovesciamento e, fra le bottiglie, sono stati inseriti idonei sistemi di separazione per evitare rotture.

### **3.3.2. Documenti di accompagnamento, di spedizione e modalità di consegna dei campioni**

Tutti i campioni prelevati, sono stati accompagnati da una scheda di campionamento e che contenevano le seguenti informazioni:

- Azienda;
- Soggetto campionatore;
- Tipo campione e dettaglio (descrizione del campione);
- Modalità e temperatura di trasporto;
- Informazioni utili alla definizione del campione e all'esecuzione delle analisi.

Prima di accettare in laboratorio sono state effettuate verifiche sulla idoneità di trasporto e conservazione del campione oltre allo stato.

I campioni, spediti e conservati nei tempi e nelle modalità richieste, sono stati oggetto di analisi microbiologiche ed eco-tossicologiche.

## 4. ANALISI MICROBIOLOGICHE

Sono stati analizzati 3 campioni di acqua provenienti da 3 Aziende che scaricano direttamente, o previo trattamento, nella rete fognaria e 6 campioni provenienti da tre Aziende alla chiusura del ciclo produttivo e dopo trattamento depurativo per la ricerca di agenti microbici. Aliquote diverse a seconda degli indicatori microbiologici sono state analizzate e in repliche.

### 4.1. Materiali e metodi

Le analisi microbiologiche hanno riguardato i seguenti parametri: Enterococchi intestinali, *Escherichia coli*, Conta Batterica Totale (CBT) a 37°C e 22°C, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*

Il metodo utilizzato è stato quello delle Membrane Filtranti (MF). In particolare, in Appendice A2 sono riportati i protocolli tecnici che sono stati seguiti.

### 4.2. Risultati analisi microbiologiche

Dal punto di vista microbiologico si nota, in Tabella 23, che dopo la depurazione, si ha notevole abbattimento della carica batterica di tutti i parametri analizzati e in particolare l'azzeramento di *E. coli*, unico parametro tra quelli indagati considerato come indicatore dalla normativa sul riutilizzo di acque reflue (Ministero Ambiente, 2003).

Tabella 23. Risultati acque industriali di riciclo 2015-2016

Cod_ Azienda	Campione	<i>E.coli</i>	Enterococchi intestinali	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	CBT 37°C	CBT 22°C
		UFC/ 100 mL	UFC/ 100 mL	UFC/ 250 mL	UFC/ 250 mL	UFC/ mL	UFC/ mL
1	A	58x10 <sup>2</sup>	30x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>5</sup>
1	B	0	17	30x10 <sup>3</sup>	22	30x10 <sup>3</sup>	30x10 <sup>3</sup>
2	A	35x10 <sup>6</sup>	62x10 <sup>7</sup>	66x10 <sup>7</sup>	30x10 <sup>7</sup>	40x10 <sup>6</sup>	94x10 <sup>6</sup>
2	B	0	10x10 <sup>3</sup>	22x10 <sup>5</sup>	81x10 <sup>4</sup>	60x10 <sup>3</sup>	80x10 <sup>3</sup>
3	A	70x10 <sup>4</sup>	34x10 <sup>4</sup>	12x10 <sup>6</sup>	32x10 <sup>7</sup>	50x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>6</sup>
3	B	0	0	23x10 <sup>4</sup>	69x10 <sup>5</sup>	0	14x10 <sup>3</sup>
4*	A	43x10 <sup>5</sup>	53x10 <sup>3</sup>	14x10 <sup>7</sup>	25x10 <sup>7</sup>	30x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>5</sup>
5*	A	1	15	30x10 <sup>5</sup>	16x10 <sup>3</sup>	30x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>5</sup>
6*	A	12x10 <sup>5</sup>	0	20x10 <sup>7</sup>	28x10 <sup>6</sup>	40x10 <sup>5</sup>	86x10 <sup>5</sup>

\*Aziende senza depuratore

Legenda: A - Campioni prima della depurazione; B - Campioni dopo la depurazione



## 5. ANALISI ECOTOSSICOLOGICHE

Al fine di valutare il potenziale riutilizzo delle acque reflue dei DM e di rilevare la loro potenziale tossicità residua prima e dopo trattamento, in questo studio è stato utilizzato un nuovo approccio sperimentale, infatti in aggiunta all'indagine chimica e microbiologica già previste dalla normativa, è stata individuata una batteria di saggi ecotossicologici (Mancini *et al.*, 2019).

I saggi eco-tossicologici hanno la finalità di rilevare, in condizioni standardizzate di laboratorio, eventuali alterazioni indotte da contaminanti chimici sugli organismi viventi, ai vari livelli di organizzazione biologica, dalla risposta sub-cellulare al livello di organismo (Tarazona *et al.*, 1995). L'indagine ecotossicologica è stata condotta su 6 campioni provenienti da tre Aziende italiane che non utilizzano un trattamento prima dello scarico in rete fognaria (A, B, C) e tre che utilizzano un trattamento (D, E, F). I campioni delle aziende D, E e F sono stati raccolti all'ingresso e all'uscita degli impianti di trattamento delle acque.

Per questo studio è stata selezionata una batteria di saggi ecotossicologici appartenenti a diversi livelli trofici:

- il batterio *Vibrio fischeri* (UNI EN ISO 11348-3:2009);
- il crostaceo *Daphnia magna* (UNI EN ISO 6341:2013);
- l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO 8692:2012);
- la pianta *Sorghum saccharatum* (UNI 11357:2010).

Per le aziende che prevedono un trattamento prima dell'immissione in rete delle acque reflue, è stato applicato un test di genotossicità per valutare l'efficacia del trattamento utilizzato il test del micronucleo sulla pianta *Vicia faba* (Gustavino *et al.*, 2013).

Infine è stato necessario aggiungere un test su vertebrato per descrivere la tossicità di un campione che presentava un andamento anomalo; allo scopo è stato scelto il test su embrioni di pesce *Danio rerio* (OECD, 2013).

### 5.1 Metodi ecotossicologici

#### 5.1.1. Test acuto con il batterio *Vibrio fischeri*

L'organismo proposto a livello internazionale per il monitoraggio della qualità di acque e sedimenti (ASTM, 2009), è il batterio luminescente *Vibrio fischeri* (ceppo NRRL-B-11177, batterio marino Gram-negativo, aerobio-anaerobio facoltativo), della famiglia delle Vibrionacee. La caratteristica di questi organismi alla base del loro utilizzo nei test di tossicità è la loro bioluminescenza. *Vibrio fischeri*, infatti, può emettere luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 490 nm, purché sia presente ossigeno. Il saggio Microtox fornisce indicazioni di tossicità acuta sulla base della riduzione della bioluminescenza naturale di batteri della specie *V. fischeri* in presenza di contaminanti. I batteri utilizzati nel test sono liofilizzati e conservati a -20 °C; al momento di eseguire il saggio la coltura viene reidratata ottenendo così una sospensione di microrganismi pronta per l'uso. Questa viene esposta per 5', 15' e 30' a diverse diluizioni del campione da saggiare. La quantità di luce emessa, opportunamente corretta per la diminuzione di luce che si verifica fisiologicamente in assenza di tossicità, è proporzionale all'effetto causato nel batterio dalle eventuali sostanze tossiche presenti nel campione da testare. La lettura della bioluminescenza viene effettuata tramite luminometro termostato a 15°C (Microtox mod. 500). Sono stati utilizzati i batteri e reagenti della Modern Water.

Per la descrizione in dettaglio della tecnica, consultare l'Appendice A3.1.

Le analisi sono state svolte in conformità della UNI CEI EN ISO/IEC 17025, essendo il Reparto Ecosistemi e Salute del Dipartimento Ambiente e Salute dell'ISS accreditato per questo metodo.

La quantità di campione necessaria per lo svolgimento del test è di 6 mL.

### **5.1.2. Test acuto con il crostaceo *Daphnia magna***

Il test è stato eseguito secondo le procedure indicate dalle organizzazioni nazionali (DL.vo 152/2006-parte terza; APAT, 2003b) e internazionali (es. OECD, ISO; EEC, USEPA, ASTM). L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna*. In condizioni normali, la *Daphnia magna* si riproduce per partenogenesi per cui, una popolazione di dafnidi è composta in toto da femmine adulte e giovani di varia età con corredo genetico uguale, in quanto madri-sorelle le une delle altre.

La riproduzione sessuata, invece, ha luogo in risposta a stimoli ambientali negativi, per cui alcuni organismi neonati, sotto influsso ormonale, diventano maschi e si accoppiano con le femmine adulte, le quali producono gli efippi, composti da due sole uova che non si sviluppano, ma restano avvolte da uno spesso strato di carapace, tipicamente di colore nero, e rimangono latenti fino al mutamento di condizioni favorevoli per il loro sviluppo.

Il test acuto con *Daphnia magna* consiste nell'espore neonati di meno di 24 h al campione di acqua da analizzare; dopo un periodo di tempo prestabilito (24 h o 48 h) si osserva la percentuale di individui sopravvissuti. I risultati possono essere espressi o come percentuale di individui morti/immobilizzati o come valore di EC<sub>50</sub>, cioè come percentuale di diluizione della matrice acquosa che determina la morte/immobilizzazione del 50% degli individui impiegati nel test.

È stato utilizzato il kit DaphniaToxkit della Microbiotest.

La quantità di campione di acqua necessaria per lo svolgimento di ogni prova è 100 mL.

Per la descrizione della tecnica vedere l'Appendice A3.2.

### **5.1.3. Test cronico con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata***

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici: l'ossigeno prodotto mediante il processo fotosintetico è indispensabile per la sopravvivenza della specie animale. La modificazione della comunità fitoplanctonica causata da effetti tossici può alterare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema. Il saggio algale, eseguito con alghe verdi unicellulari, è un valido strumento di indagine capace di fornire risposte utili nell'attività di monitoraggio ambientale. Il test cronico d'inibizione della crescita algale studia l'effetto tossico di una sostanza chimica sulle diverse generazioni di un clone algale (OECD, 2002; ISO 8692:2012). L'utilizzo della specie *Pseudokirchneriella subcapitata* è diventato uno strumento di indagine molto diffuso per monitorare gli ambienti acquatici. Le microalghe si trovano in una condizione di immobilità in una speciale matrice in cui sopravvivono per parecchi mesi senza perdere la loro vitalità. Dopo un preliminare lavaggio per eliminare la sostanza inerte e trasferite in un adeguato terreno di coltura, le alghe riprendono immediatamente a crescere e possono essere utilizzate per il test.

È stato utilizzato il kit della Microbiotests; per ciascun campione è stata utilizzata una quantità di circa 75 mL per diluizione effettuata.

Per la descrizione in dettaglio della tecnica, consultare l'Appendice A3.3.

#### 5.1.4. Test di fitotossicità con la pianta monocotiledone *Sorghum saccharatum*

I saggi di fitotossicità offrono la possibilità di evidenziare l'effetto cumulativo e/o sinergico di più agenti inquinanti, inoltre sono generalmente metodi veloci e con un impegno economico piuttosto contenuto.

Questo test valuta gli effetti sulla germinazione e sull'accrescimento radicale di una monocotiledone *Sorghum saccharatum* (Appendice A3.4).

Il controllo negativo è stato eseguito direttamente con acqua distillata con la quale si eseguono le diluizioni dei campioni. Al termine del test per ciascuna replica si misura l'allungamento radicale e del germoglio. Nel test di fitotossicità i dati di germinazione media, di lunghezza della radice e del germoglio in mm di ciascuna plantula, sono stati combinati per il calcolo dell'Indice di Germinazione dei singoli campioni.

$$IG = \frac{Gc \times Lc}{Gt \times Lt} \times 100$$

dove IG = Indice di Germinazione

Gc = numero medio di semi germinate del campione

Lc = lunghezza radicale media del campione

Gt = numero medio di semi germinati nel controllo

Lt = lunghezza radicale media del controllo.

Per il calcolo dell'inibizione di germinazione (HG) viene utilizzata la formula:

$$HG = 100 - IG$$

#### 5.1.5. Test del micronucleo con la pianta *Vicia faba* (MN test)

Il test del micronucleo (*MicroNucleus Test*, MN test) è considerato uno dei metodi più idonei per identificare la risposta integrata all'esposizione ad una miscela complessa di contaminanti perché rappresenta un indice del danno genetico accumulato complessivamente durante la vita di un organismo esposto. La sua applicazione in sistemi vegetali, particolarmente indicata per la rilevazione di mutageni presenti nelle acque e nel suolo permette l'analisi di matrici ambientali grezze, evitando processi di purificazione e concentrazione. In mutagenesi ambientale, e in particolare per l'esecuzione del MN-test, *Vicia faba* è una delle specie vegetali più utilizzate, soprattutto per la sua elevata sensibilità agli effetti mutageni. Il test è stato eseguito seguendo la linea guida in Rapporti ISTISAN 13/27 (Gustavino *et al.*, 2013) (Appendice A3.5). Il principio del test si basa sull'esposizione di semi di *V. faba* ai campioni in diversi tempi di esposizione. Al termine dei quali verranno conteggiata al microscopio la frequenza dei micronuclei presenti nei preparati delle radici secondarie per stimare l'entità del danno mutageno rilevato rispetto al controllo negativo.

#### 5.1.6. Test acuto con embrioni di pesce *Danio rerio*

Il test acuto con embrioni di pesce (*Fish Embryo Toxicity*, FET test) con *Danio rerio* viene condotto su embrioni della specie ittica d'acqua dolce *Danio rerio*, considerato "organismo modello" per i vertebrati sia in campo biochimico che ecotossicologico; il suo genoma è stato completamente descritto, le risposte biochimiche risultano simili a quelle dei vertebrati condividendo *pathways* molecolari con i mammiferi. L'utilizzo di *D. rerio*, inoltre, presenta indubbi vantaggi operativi: fecondazione planctonica, produzione numerosa di uova, corion trasparente, crescita rapida e bassi costi di gestione.

Il test è stato condotto seguendo la norma OECD 236 del 2013 (OECD, 2013) che prevede l'esposizione di singole uova in piastre multi pozzetto per valutare la potenziale tossicità del campione. Il test inizia nelle primissime fasi dopo la fecondazione delle uova, è stato allestito in triplo esponendo un totale di 60 uova per ciascun campione. Le piastre sono state incubate a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  con ciclo luce-buio per 96 ore come da norma (Appendice A3.6).

## 5.2. Risultati delle analisi ecotossicologiche

Dall'elaborazione dei risultati dei test ecotossicologici compiuti sui campioni si evidenzia, tra le Aziende sprovviste di un sistema di depurazione delle acque reflue, una sostanziale generalizzata tossicità sugli organismi utilizzati e, tra le Aziende con un sistema di depurazione, un evidente calo della tossicità delle acque in seguito al processo di depurazione (Tabelle 24-27).

**Tabella 24. Risultati dell'analisi ecotossicologica, espressi in percentuale di effetto, per i campioni provenienti dalle Aziende che non utilizzano trattamenti di depurazione delle acque reflue**

Azienda	<i>V. fischeri</i> inibizione luminescenza	<i>D. magna</i> immobilità	<i>S. saccharatum</i>		<i>P. subcapitata</i> inibizione crescita
			inibizione germoglio	crescita radice	
A	<b>98,58</b>	<b>65</b>	10,1	21	<20
B	<0	<b>35</b>	<b>30,5</b>	<b>35,5</b>	<20
C	<b>100,00</b>	<b>100</b>	1,6	-12,4	<20

In **grassetto** i valori dei campioni considerati tossici

**Tabella 25. Risultati dell'analisi ecotossicologica, espressi in percentuale di effetto, per i campioni provenienti dalle Aziende che utilizzano trattamenti di depurazione delle acque reflue**

Azienda	Trattamento	<i>V. fischeri</i> inibizione luminescenza	<i>D. magna</i> immobilità	<i>S. saccharatum</i>		<i>P. subcapitata</i> inibizione crescita
				inibizione germoglio	crescita radice	
D	prima	<b>95,26</b>	<b>100</b>	19,6	9,7	<20
	dopo	<0	<b>30</b>	-2,6	-10,4	<20
E	prima	<b>100</b>	<b>100</b>	28,6	<b>50,8</b>	<20
	dopo	25,37	<b>25</b>	29,4	19,1	<20
F	prima	18,07	<b>55</b>	21,5	-10,3	<b>21</b>
	dopo	<0	<b>40</b>	<b>63,1</b>	<b>47,3</b>	<b>42</b>

In **grassetto** i valori dei campioni considerati tossici

**Tabella 26. Risultati del test di tossicità FET sugli embrioni di pesce *Danio rerio* per il campione F, espressi in percentuale di mortalità e percentuale di effetto subletale**

Azienda	Trattamento	Mortalità	Effetti subletali			Totale
			Ritardo schiusa	Depigmentazione	Deformità scheletriche	
F	prima	5	37	5	11	53
	dopo	5	16	-	-	16

**Tabella 27. Risultati dell'MN test su *Vicia faba* per i campioni provenienti delle Aziende che utilizzano un trattamento di depurazione delle acque reflue, prima e dopo tale processo a diversi tempi di esposizione. I risultati sono espressi come frequenze MN (media  $\pm$  errore standard) e Media ( $\pm$  errore standard, ES) dell'indice mitotico (su 1000 cellule / apice).**

Azienda	Trattamento	Frequenza MN (‰)				Indice mitotico			
		4+20 h	4+68 h	24 h	72 h	4+20 h	4+68 h	24 h	72 h
D	prima	0,4 ( $\pm 0,2$ )	1,2 ( $\pm 0,5$ )	0,6 ( $\pm$ )	0,3 ( $\pm 0,2$ )	46,7 ( $\pm 6,5$ )	42,3 ( $\pm 5,6$ )	60,7 ( $\pm 4,8$ )	60,1 ( $\pm 4,0$ )
	dopo	0,2 ( $\pm 0,1$ )	0,5 ( $\pm 0,3$ )	0,4 ( $\pm$ )	0,3 ( $\pm 0,2$ )	56,5 ( $\pm 3,5$ )	64,2 ( $\pm 5,0$ )	63,3 ( $\pm 2,9$ )	52,3 ( $\pm 3,8$ )
E	prima	0,4 ( $\pm 0,2$ )	2* ( $\pm 0,9$ )	2,7** ( $\pm 1,5$ )	n.d.	50,2 ( $\pm 4,0$ )	54,2 ( $\pm 3,6$ )	n.d.	n.d.
	dopo	4,7** ( $\pm 2,0$ )	2** ( $\pm 0,7$ )	1,9** ( $\pm 0,5$ )	2,1** ( $\pm 0,9$ )	57,5 ( $\pm 7,5$ )	51,1 ( $\pm 4,2$ )	67,6 ( $\pm 2,9$ )	63,2 ( $\pm 3,8$ )
F	prima	3*** ( $\pm 0,4$ )	0,7 ( $\pm 0,4$ )	2,2** ( $\pm 0,8$ )	9,2** ( $\pm 3,7$ )	50,9 ( $\pm 5,0$ )	54,1 ( $\pm 2,0$ )	32,2 ( $\pm 2,6$ )	56,8 ( $\pm 3,0$ )
	dopo	1* ( $\pm 0,3$ )	2,7** ( $\pm 0,8$ )	3,3*** ( $\pm 0,9$ )	2,2** ( $\pm 0,9$ )	54,8 ( $\pm 2,6$ )	31,1 ( $\pm 5,2$ )	60,6 ( $\pm 4,5$ )	62,6 ( $\pm 2,3$ )
<b>Controllo positivo</b>		102,3 ( $\pm 11,7$ )				51,5 ( $\pm 3,7$ )			
<b>Controllo negativo</b>		0,1 ( $\pm 0,1$ )				52,8 ( $\pm 6,7$ )			

\* Frequenza MN leggermente significativa.

\*\* Frequenza MN mediamente significativa.

\*\*\* Frequenza MN altamente significativa.

n.d. dato non disponibile

Più in dettaglio, il test con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri* ha evidenziato una elevata tossicità con valori di percentuale di inibizione prossimi al 100 per la totalità delle Aziende (escluso Azienda B), ma si osserva un consistente calo o abbattimento della inibizione della bioluminescenza nelle acque dei campioni in seguito al processo di depurazione.

Il test con *Daphnia magna* ha rilevato una elevata tossicità in tutti i campioni ma è evidente anche per questo saggio, un calo della tossicità delle acque in seguito al trattamento di depurazione in quelle Aziende che ne sono provviste.

Per il test di fitotossicità, i campioni sono stati considerati fitotossici se la percentuale di inibizione della germinazione è maggiore al 30%. Tra i campioni in esame si evidenzia una unica positività certa in un campione prima della depurazione, infatti solo il campione delle acque reflue non trattate dell'azienda B ha mostrato tossicità per il *S. saccharatum*, si sottolinea, inoltre, un aumento di tossicità per l'azienda F dopo il trattamento.

Nel test algale con *Pseudokirchneriella subcapitata*, per il trattamento dei dati di inibizione della crescita secondo la ISO Standard 8692 - Sezione 9 "Interpretazione dei dati", ci si è avvalsi di un foglio di calcolo Excel opportunamente predisposto. Si considerano tossici i campioni per i quali viene evidenziata una inibizione pari a  $\geq 20\%$ . Non si registrano campioni tossici per l'alga tranne che per il campione F dopo trattamento.

Il test del micronucleo applicato ai campioni provenienti dalle aziende che utilizzano un trattamento prima dello scarico in rete delle acque reflue, ha mostrato una situazione mista delle frequenze MN a diversi tempi di esposizione. In particolare, il campione E ha mostrato frequenze

micronuclei molto significative prima e dopo il processo di purificazione e il campione F ha mostrato un effetto di genotossicità soprattutto dopo il trattamento.

Pertanto per i campioni di Aziende che non utilizzano processi di trattamento delle acque si registra la stessa tendenza di tossicità per tutti gli organismi utilizzati nella batteria, individuando *D.magna* e *V.fischeri* come organismi più sensibili. Mentre tra le aziende con un sistema di depurazione, si registra un evidente calo della tossicità delle acque in seguito a tale processo. In particolare per i campioni D e E i test ecotossicologici evidenziano, infatti una notevole tossicità delle acque reflue prima del trattamento, mentre è stata registrata una evidente riduzione in uscita dall'impianto di trattamento. Per questi due campioni di acque reflue, *V.fischeri* e *D.magna* mostrano ancora una volta la sensibilità maggiore. Il campione F, sebbene presenti una tossicità iniziale più bassa rispetto a D ed E, mostra una situazione anomala più complessa e le specie in esame sottolineano effetti diversi. Per questo campione *V.fischeri* è il test meno sensibile mentre il sorgo e l'alga sono più sensibili, ma mostrano una tendenza opposta che è un evidente aumento della tossicità dopo il trattamento.

Per studiare ulteriormente il campione F che presenta un'apparente inversione di tossicità è stato aggiunto un ulteriore test ecotossicologico, il FET test, che utilizza embrioni di pesce *Danio rerio*. Sebbene il FET mostri una bassa tossicità prima e dopo il trattamento di depurazione, si devono mettere in evidenza importanti osservazioni. Infatti, gli embrioni esposti presentano diversi effetti subletali soprattutto prima del trattamento, principalmente legati al ritardo nella schiusa, questo a conferma della presenza di sostanze potenzialmente tossiche nel campione di acqua prima del trattamento così come mostrato anche da *D.magna* e *V.fischeri*

In conclusione l'efficienza del trattamento delle acque reflue è chiaramente indicata da *V.fischeri*, *D.magna* e *D.rerio*. I risultati genotossici sui semi di *Vicia faba* confermano la tendenza opposta della tossicità evidenziata per il campione F in accordo con l'alga e le specie vegetali utilizzate nella batteria. È plausibile, pertanto, ipotizzare che durante il processo di depurazione potrebbero essere state prodotte o aggiunte sostanze genotossiche per le specie vegetali.

## 6. DECALOGO DEL RISPARMIO IDRICO NELL'INDUSTRIA

Tra i prodotti del progetto Risparmio Idrico nella produzione industriale dei Dispositivi Medici (RIDM) è stata edita una prima stesura di un possibile decalogo del risparmio idrico nell'industria dei dispositivi medici. Questa prima proposta è stata presentata nel corso del Convegno "Il risparmio idrico nell'industria dei dispositivi medici" tenutosi all'Istituto Superiore di Sanità il 24 maggio 2016, a cui hanno preso parte tutti gli *stakeholder* coinvolti. Inoltre, i risultati di questo studio sono stati presentati anche al XV Simposio Italo Ungherese di spettrochimica (Mancini *et. al.*, 2016).

Il flusso concettuale ha avuto inizio dalla consapevolezza di quanto l'acqua incide sul percorso industriale, alla pianificazione/programmazione, all'attuazione, al controllo e alle azioni/correzioni. Tale percorso si è espletato attraverso un processo partecipativo che ha portato alla condivisione, tra tutti i partecipanti, di proposte/dissenzi/ modifiche o accordo.

La Figura 16 rappresenta la sintesi scaturita al termine del processo partecipativo, in cui sono esplicitati i 10 principi condivisi fra tutti gli *stakeholder* e che hanno dato origine al decalogo per il risparmio idrico.

**RIDM**  
Risparmio Idrico nella produzione industriale dei Dispositivi Medici

**Decalogo**  
10 ASPETTI DA CONSIDERARE PER IL RISPARMIO IDRICO NELL'INDUSTRIA

1. Programmare e attuare politiche di gestione aziendale volte al risparmio idrico (migliorare i processi di utilizzo dell'acqua aiuta a migliorare i processi di produzione industriale)
2. Contribuire allo sviluppo dei principi e delle politiche in materia idrica, in collaborazione con le principali parti interessate
3. Valutare le future disponibilità dell'acqua utilizzata nel contesto del territorio
4. Ridurre al minimo il prelievo diretto dell'acqua dalla rete e/o dai corpi idrici superficiali e sotterranei
5. Monitorare i volumi di acqua utilizzata nelle varie parti del processo produttivo, compreso il prodotto finale
6. Quantificare i volumi di acqua utilizzata nelle diverse linee di produzione
7. Programmare le lavorazioni in maniera tale da ridurre al minimo i lavaggi
8. Macchine/ambienti – utilizzare attrezzature e/o equipaggiamenti idonei per il risparmio idrico
9. Verifica costante delle potenzialità di riutilizzo dell'acqua di processo
10. Riuso Risparmio Riciclo

**Figura 16. Decalogo del Risparmio/Riuso/Riciclo della risorsa Idrica nell'industria dei Dispositivi Medici**

Durante il percorso partecipato è stato sottoposto ai convenuti un altro aspetto conseguente alla condivisione di azioni volte ad attuare le 3R (Risparmio, Riciclo, Riuso) che chiedeva se vi era disponibilità, consapevolezza ad adottare un sistema di certificazione volontaria per quelle Aziende che stanno adottando o hanno adottato la politica delle 3R.

Il tema è stato così proposto: “Dal risparmio/riuso alla certificazione dell’azienda e/o del prodotto”.

Questo aspetto ha avuto il maggior numero di consensi (*vedi* Figura 16) e di conseguenza si sono tracciate le prime linee di attuazione di un possibile “blue drop” per identificare un prodotto da una filiera che attua le 3R.



## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'uso delle risorse idriche in Italia è stimato essere di circa 60% in agricoltura, il 25% nel settore energetico e industriale e il 15% per usi domestici.

Naturalmente, l'utilizzazione dell'acqua varia a seconda della sua accessibilità, della sua quantità, della sua qualità e della situazione socio-economica delle regioni interessate. Il consumo idrico nell'industria assume rilievo nei Paesi industrializzati, di rispetto a quelli del Sud del mondo.

Le acque reflue sono le acque contenenti i rifiuti delle varie attività umane dirette o indirette; la normativa distingue e definisce i vari tipi di acque reflue (DLvo. 16 gennaio 2008 n. 4 correttivo e integrativo del DLvo 152/2006). Le acque reflue industriali inquadrando come qualsiasi tipo di acque reflue scaricate da edifici o impianti in cui si svolgono attività commerciali o di produzione di beni, diverse dalle acque reflue domestiche e da quelle meteoriche di dilavamento, intendendosi per tali anche quelle venute in contatto con sostanze o materiali, anche inquinanti, non connessi con le attività esercitate nello stabilimento. Le acque reflue urbane come acque reflue domestiche o il miscuglio di acque reflue domestiche, di acque reflue industriali ovvero meteoriche di dilavamento convogliate in reti fognarie, anche separate, e proveniente da agglomerato. Le acque reflue domestiche: acque reflue provenienti da insediamenti di tipo residenziale e da servizi e derivanti prevalentemente dal metabolismo umano e da attività domestiche.

L'impiego e il reimpiego per uso industriale possono avvenire nell'ambito dei servizi generali di fabbrica (circuiti di raffreddamento, caldaie, ecc.) oppure in processi specifici, nei settori tessile, conciario e perché no anche nella produzione di DM, ecc.

Per citare solo alcuni casi, il comprensorio tessile di Prato alimenta un acquedotto industriale con acque superficiali miscelate con acque reflue industriali depurate; le acque di concia in alcune aree nazionali sono parzialmente reimpiegate. Anche l'industria metallurgica può giovare del riutilizzo. Per i riutilizzi diretti, in Italia, non vi sono standard di legge: il DM Ambiente 185/2003 non stabilisce requisiti di qualità per questa tipologia di reimpiego, se interno all'Azienda o al consorzio industriale. Il riferimento va quindi trovato nella letteratura tecnica e i limiti di qualità differiscono in funzione dello specifico riutilizzo.

Uno dei principi fondamentali della gestione sostenibile del ciclo delle acque consiste nel considerare le acque di scarico come parte di un sistema completo (*Sustainable Sanitation*) e nell'esaminare non solo il trattamento e lo scarico delle acque reflue, ma anche l'intero processo di consumo delle risorse idriche.

Così le acque reflue, invece di essere considerate sostanze da eliminare, diventano una risorsa idrica. Tale approccio permette di progettare le varie parti allo scopo di ottimizzare il sistema nel suo complesso. Nel caso dell'uso dell'acqua a scopo industriale tale approccio si può facilmente estendere a tutta la filiera produttiva.

La direttiva Quadro Acque 2000/60/CE ha tra gli obiettivi: evitare l'ulteriore degrado e migliorare lo stato degli ecosistemi acquatici e terrestri collegati; garantire la disponibilità futura delle risorse e gli usi prioritari: consumo umano e usi produttivi; minimizzare l'inquinamento e l'emissione di inquinanti nell'ambiente e tutelare la qualità dei corpi idrici (approccio integrato); ridurre i rischi di inondazioni e siccità.

La Direttiva è stata recepita in Italia con il DLvo 152/2006 recante norma in materia ambientale, ha attribuito al Ministro dell'ambiente e della tutela del territorio il compito di stabilire le norme tecniche relative al riutilizzo delle acque reflue, domestiche, urbane e industriali. Nello stesso decreto viene presa in esame la tutela quantitativa delle risorse idriche dall'art. 95, comma 1, dello stesso Decreto "Concorre al raggiungimento degli obiettivi di qualità

attraverso una pianificazione delle utilizzazioni delle acque volte ad evitare ripercussioni sulla qualità delle stesse e a consentire un consumo idrico sostenibile”.

Il DL.vo 152/2006, per quanto concerne i limiti di emissione degli scarichi idrici in acque superficiali e in fognatura, prevede l'esecuzione obbligatoria di un saggio di tossicità acuta, come riportato nella Parte terza, Allegato 5, Tabella 3 “Valori limite di emissione in acque superficiali e in fognatura”, di cui la Tabella 28 rappresenta un estratto.

Oltre a *Daphnia magna*, possono essere eseguiti saggi di tossicità acuta su altri organismi test, tra cui i batteri bioluminescenti (nota 5 alla Tabella 3). Il saggio di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* ha trovato ampia diffusione. Va, tuttavia, evidenziato che la positività del test di tossicità non prevede l'applicazione diretta delle sanzioni di cui al Titolo V “Bonifica di siti contaminati” ma determina, da parte degli organi di controllo, l'obbligo di approfondimento analitico per l'individuazione degli analiti responsabili della tossicità al fine di rimuoverne le cause.

Per quanto riguarda gli indicatori microbiologici è richiesto dalle suddette norme *Escherichia coli* 10 (UFC/100 mL) (80% dei campioni) 100 valore % max. Per le acque reflue recuperate provenienti da lagunaggio o fitodepurazione valgono i limiti di 50 (80% dei campioni) e 200 UFC/100 mL (valore puntuale massimo), *Salmonella spp.*: assente.

**Tabella 28. Estratto da: Tabella 3 “Valori limite di emissione in acque superficiali e in fognatura” (DL.vo 152/2006 Allegato 5)**

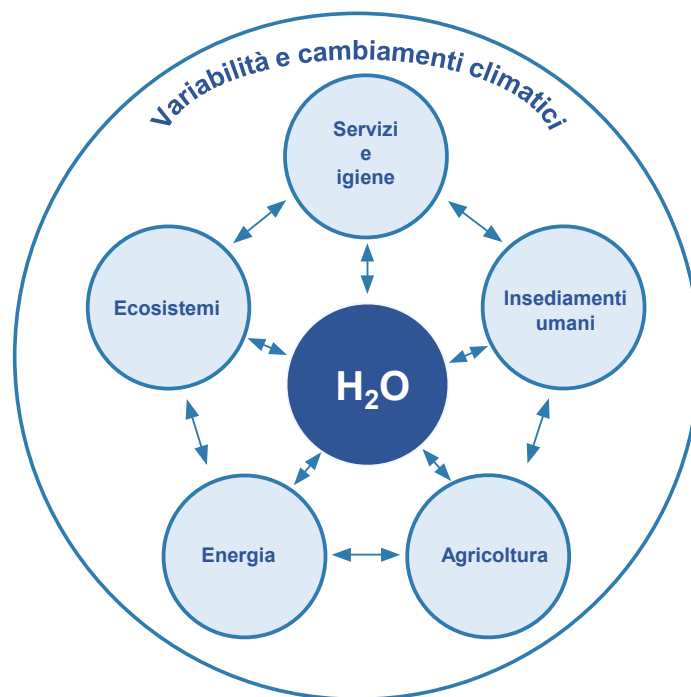
N. Parametro	Nota	Unità di misura	Scarico in acque superficiali
50	Limiti di emissione per le acque reflue urbane e industriali che recapitano sul suolo <i>Escherichia coli</i>	UFC/100 mL	
51	Saggio di tossicità su <i>Daphnia magna</i>	LC <sub>50</sub> 24h	il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale.

In sede di autorizzazione allo scarico dell'impianto per il trattamento di acque reflue urbane, da parte dell'autorità competente andrà fissato il limite più opportuno in relazione alla situazione ambientale e igienicosanitario del corpo idrico recettore e agli usi esistenti; si consiglia un limite non superiore ai 5000 UFC/100 mL.

In questa sede va sottolineato che la scelta effettuata dalle Aziende in materia di fonte di approvvigionamento e di eventuale ricorso al riciclo delle proprie acque o al reimpiego di acque reflue depurate (ove ve ne sia la disponibilità) è determinata, sostanzialmente, da considerazioni economiche o di bilancio sostenibile per quelle Aziende che hanno avviato un percorso virtuoso.

Se si tiene conto del fatto che l'approvvigionamento di acqua da pozzi o da corpi idrici superficiali ha un costo intorno a 0,02 €/m<sup>3</sup>, appare evidente che né gli agricoltori, né le industria che attualmente si rivolgono a tali fonti di approvvigionamento possono avere interesse al riutilizzo. Diverso è il caso dell'approvvigionamento da acquedotto, i cui costi sono solitamente compresi tra 0,5 e 0,8 €/m<sup>3</sup>.

Appare dunque evidente che il riutilizzo di acque reflue depurate, ove sia ritenuto opportuno, è legato a interventi normativi che incidano sui costi di approvvigionamento da altre fonti e/o al divieto di approvvigionamento da fonti più nobili (Sanviti, 2003; Genon, 2003). Tuttavia il risparmio idrico è incentivato nelle norme di settore e nella gestione sostenibile della risorsa il riutilizzo delle acque e dei reflui sono una risorsa (Figura 17).



**Figura 17. Interazione tra l'acqua e i principali settori socio economici che sono influenzati dalla variabilità climatica (modificato da UNESCO, 2020)**

Sicuramente il settore dei DM non è il primo che si è interessato ed ha abbracciato l'idea di un recupero e reimpiego dell'acqua utilizzata nei propri processi, evidenza si è avuta anche in questo studio sperimentale in cui del campione iniziale di 26 ditte solo meno del 50% ha acconsentito a condividere le proprie informazioni e dati sull'argomento, e, di queste, solo una ha ad oggi già attivamente preso coscienza della necessità di avere un approccio proattivo. Probabilmente tale situazione, apparentemente lontana da un coinvolgimento attivo in processi di recupero, scaturisce da iniziali difficoltà progettuali e di fattibilità, da problemi connessi con possibili contaminazioni da parte delle sostanze utilizzate nei cicli produttivi con cui spesso l'acqua può venire a contatto, o solo per ragioni storiche che preferivano concentrare risorse e sforzi delle aziende solo sulla produzione del DM perché più importante, in quanto notoriamente di fondamentale importanza per la salute dell'uomo, ma ora che si sta cominciando a comprendere quanto l'ambiente e le sue risorse fondamentali, come l'acqua, siano parimenti importanti per la salute dell'uomo, anche il settore dei DM sta volgendo lo sguardo verso produzioni più green e verso tutte le attività connesse con il riciclo e il riutilizzo.

Organismi internazionali hanno emanato documenti, per implementare il riutilizzo delle acque reflue trattate in Europa, analizzando i cambiamenti tecnici, ambientali, sanitari e le sfide socio-economiche associati a tale riutilizzo (Alcade Sanz, 2014) che possono supportare le aziende nello sviluppo e adozione di politiche sostenibili.

Poiché siamo in assenza di linee guida ufficiali a livello europeo per affrontare il riutilizzo delle acque reflue trattate, nel rapporto "Water reuse in Europe" vengono confrontate le normative nazionali e internazionali attualmente in essere, si fornisce un approccio alla gestione delle acque reflue basato sulla valutazione dei rischi e si offre una panoramica delle esigenze e degli ostacoli all'innovazione tecnologica e normativa. Il tema dell'innovazione è uno dei cardini della "Strategia Europa 2020" perché, con il progressivo invecchiamento della popolazione e una

competitività sempre più pressante, la futura crescita economica e l'occupazione saranno sempre più agganciate alla capacità di innovare in termini di prodotti, servizi e modelli di business. Per questo la Commissione Europea si sta adoperando affinché i finanziamenti per la ricerca e l'innovazione siano più accessibili in modo tale che la progettualità possa concretizzarsi in prodotti e servizi.

Nell'odierna crisi economica, le eco-industrie potrebbero svolgere un ruolo fondamentale, per questo un altro obiettivo dell'UE è quello di cercare di rimuovere gli ostacoli normativi che ne impediscono la piena competitività e di incentivare l'adozione di soluzioni più sostenibili per gli altri tipi di Aziende.

La filosofia delle 3 R riportata nel decalogo nel capitolo dedicato rispecchia le conclusioni di questo progetto pilota. Le acque industriali possono essere:

- Risparmiate;
- Riusate;
- Riciclate.

Questo approccio può apportare vantaggi diretti in termini di risparmio quantitativo e, indiretti, in termini di minor impatto qualitativo degli effluenti, comunque, sversati; oltre a migliorare l'equilibrio del sistema idrico;

Questa filiera virtuosa è già applicata in alcune Aziende che producono DM e in altre è in corso di conseguenza è possibile che tali Aziende possano essere di volano per il cambiamento ma che possano informare il cittadino per percorso avviato ad esempio anche mostrandolo sui prodotti con un simbolo come ad esempio il bollino "BLUE DROP".

## BIBLIOGRAFIA

- Alcalde Sanz L, Gawlik B. *Water reuse in Europe - Relevant guidelines, needs for and barriers to innovation*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2014. (JRC Science and Policy Report).
- APAT IRSA/CNR. 1030 - Metodi di campionamento. In: *Metodi analitici per le acque. Volume Primo. Sezione 1000 - Parte generale*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici, Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche; 2003a. (APAT: Manuali e linee guida 29/2003). p. 75-85
- APAT IRSA/CNR. 8020 -Metodi di valutazione della tossicità con Daphnia. In: *Metodi analitici per le acque. Sezione 8000 – Metodi ecotossicologici*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici, Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche; 2003b. (APAT: Manuali e linee guida 29/2003). p. 993-1002.
- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21<sup>th</sup> ed*. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation; 2005.
- ASTM D5660-96 (2009). *Standard test method for assessing the microbial detoxification of chemically contaminated water and soil using a toxicity test with a luminescent marine bacterium* (Withdrawn 2014). West Conshohocken, PA: ASTM International; 2009.
- Buytaert W, Moulds S, Acosta L, De Bièvre B, Olmos C, Villacis M, Tovar C and Verbist K. Glacial melt content of water use in the tropical Andes. *Environmental Research Letters* 2017;12:114014. doi.org/10.1088/1748-9326/aa926c.
- Council of Europe. Alternative methods for control of microbiological quality: In: *European Pharmacopoeia. 6th ed*. Strasbourg: Council of Europe; 2007 Vol. 1. 5.1.6-; p. 532.
- Council of Europe. Microbiological examination of non-sterile products: total viable aerobic count. In: *European Pharmacopoeia. 6th ed*. Strasbourg: Council of Europe; 2007. Vol. 1. 2.6.12.; p. 166.
- Council of Europe. Microbiological examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms. In: *European Pharmacopoeia. 6th ed*. Strasbourg: Council of Europe; 2007 Vol. 1. 2.6.13; p. 173.
- Council of Europe. Microbiological quality of pharmaceutical preparations: In: *European Pharmacopoeia. 6th ed*. Strasbourg: Council of Europe; 2007 Vol. 1. 5.1.4.; p. 529.
- Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 327, 22 dicembre 2000
- Europa. Direttiva 93/42/CEE del Consiglio, del 14 giugno 1993, concernente i dispositivi medici. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 169, 12 luglio 1993.
- Europa. Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 5 aprile 2017, relativo ai dispositivi medici, che modifica la direttiva 2001/83/CE, il regolamento (CE) n. 178/2002 e il regolamento (CE) n. 1223/2009 e che abroga le direttive 90/385/CEE e 93/42/CEE del Consiglio (Testo rilevante ai fini del SEE). *Gazzetta Ufficiale della Unione europea* L117/1, 5 maggio 2017.
- FAO. *Coping with water scarcity: an action framework for agriculture and food security*. Rome: Food and Agriculture Organization; 2012 (FAO Water Reports No. 38).
- Genon G, Zanetti MC. Il riutilizzo in campo industriale: studi ed esperienze. In: *Atti della 23° Giornata di Studio di Ingegneria sanitaria-Ambientale*, Cremona, 20 novembre 2003.

- Gustavino B, Caciolli S, Mancini L (Ed.). *Linea guida del test dei micronuclei in Vicia faba per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/27).
- Huss M, Bookhagen B, Huggel C, Jacobsen D, Bradley RS, Clague JJ, Vuille M, Buytaert W, Cayan DR, Greenwood G, Marck BG, Milner AM, Weingartner R, Winder M. Toward mountains without permanent snow and ice. *Earth's Future* 2017;5:418-35.
- IPCC. *IPCC special report on the ocean and cryosphere in a changing climate*. Geneva: Intergovernmental Panel on Climate Change; 2019.
- IRPET (Istituto regionale Programmazione Economica Toscana). *Stima dei consumi idrici nell'industria e nel terziario in Toscana. Rapporto Tecnico*. Firenze: Regione Toscana; 2009.
- ISO 16266:2006. *Water quality -- Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa -- Method by membrane filtration*. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
- ISO 8692:2012: *Water quality -- Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.
- Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 99. Attuazione della direttiva n. 86/278/CEE concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 38 del 15 febbraio 1992 - Suppl. Ordinario n. 28.
- Italia. Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, parte III Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e gestione delle risorse idriche. *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 – Suppl. Ordinario n. 96.
- Italia. Legge 15 dicembre 2004, n. 308. Delega al Governo per il riordino, il coordinamento e l'integrazione della legislazione in materia ambientale e misure di diretta applicazione. (*Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 302 del 27 dicembre 2004 - Suppl. Ordinario n. 187.
- Italia. Legge 23 marzo 2001, n. 93 Disposizioni in campo ambientale. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n.79 del 4 aprile 2001.
- Italia. Legge 5 gennaio 1994, n. 36. Disposizioni in materia di risorse idriche. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 14 del 19 gennaio 1994 - Suppl. Ordinario n. 11.
- Mancini L, D'Angelo AM, Caciolli S, Marcheggiani S, Puccinelli C, Volpi F, Romanelli C, Guarino C, Fabiani S, Grifoni R. A Pilot study for the waste water reuse by medical device manufacturers. In: *Conference Abstract book of the IHSS 2016, XV Italian-Hungarian Symposium on Spectrochemistry, June 12-16 2016, Pisa, Italy*.
- Mancini L, Lacchetti I, Caciolli S, Puccinelli C, D'Angelo AM, Marchini S, Giuseppetti R, Pierdominici E, Marcheggiani S, Carere M. Wastewater reuse in the industry: an eco-geno-toxicological approach. *Fresenius Environmental Bulletin* 2019; 28(6): 4974-8.
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio. Decreto 12 giugno 2003, n. 185. Regolamento recante norme tecniche per il riutilizzo delle acque reflue in attuazione dell'articolo 26, comma 2, del D.Lgs. 11 maggio 1999, n. 152. *Gazzetta Ufficiale* n. 169 del 23 luglio 2003.
- Ministero della Salute. Decreto 22 dicembre 2004. Disciplina concernente le deroghe alle caratteristiche di qualità delle acque destinate al consumo umano che possono essere disposte dalle regioni e dalle province autonome. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 34 del 11 febbraio 2005.
- Ministero Della Salute. Decreto 23 dicembre 2003. Disciplina concernente le deroghe alle caratteristiche di qualità delle acque destinate al consumo umano che possono essere disposte dalle regioni Campania, Emilia-Romagna, Lombardia, Sicilia, Toscana e dalle province autonome di Bolzano e Trento. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 302 del 31 dicembre 2003.
- Ministero della Salute. Decreto 7 febbraio 2012 n. 25. Disposizioni tecniche concernenti apparecchiature finalizzate al trattamento dell'acqua destinata al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 69, del 22 marzo 2012.

- OECD. *Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development Publishing; 2011.
- OECD. *Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test*. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development Publishing, 2013.
- Sanviti S, D'Angelo G (Ed.). *Atti della 23a Giornata di Studio di Ingegneria Sanitaria Ambientale su "Il riutilizzo delle acque reflue, risparmio idrico e riduzione dell'impatto sull'ambiente"*, Cremona, 20 novembre 2003.
- Tarazona JV, Carballo M, Castano A, Munoz MJ. The role of cell biology on the application of toxicology to environmental sciences: biological assessment of pollution and biomarkers. In: Cajaraville MC (Ed.). *Cell biology in environmental toxicology*, Bilbao: UPV Editorial Service; 1995. p.15-28.
- UNESCO WAPP (World Water Assessment Programme). *Rapporto mondiale delle Nazioni Unite sullo sviluppo delle risorse idriche 2019. Nessuno sia lasciato indietro. Sintesi*. Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; 2019.
- UNESCO WWAP (World Water Assessment Programme). *Rapporto mondiale delle Nazioni Unite sullo sviluppo delle risorse idriche 2018: soluzioni basate sulla natura per la gestione dell'acqua, fatti e cifre*. Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; 2018 (SC-2018/WS/5; CLD 350.18)
- UNESCO WWAP (World Water Assessment Programme). *The United Nations World Water Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk (Vol. 1), Knowledge Base (Vol. 2) and Facing the Challenges (Vol. 3)*. Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; 2012.
- UNESCO WWAP (World Water Assessment Programme). *Water and Climate Change, The UN World Water Development Report 2020. The 2020 edition of the World Water Development Report (WWDR 2020)*. Paris. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; 2020.
- UNESCO. *UN-Water. United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change*. Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization; 2020.
- UNI 11357:2010. *Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in Cucumis sativus L. (Cetriolo), Lepidium sativum L. (Crescione), Sorghum saccharatum Moench (Sorgo) - Saggio di tossicità cronica breve*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2010.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione:2005.
- UNI EN ISO 11348-3. *Qualità dell'acqua; Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti). Metodo con batteri liofilizzati*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2009
- UNI EN ISO 5667-1. *Qualità dell'acqua – Campionamento – Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2007.
- UNI EN ISO 5667-16. *Qualità dell'acqua Campionamento Guida ai saggi biologici dei campioni*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2007.
- UNI EN ISO 5667-3. *Qualità dell'acqua; Conservazione e trattamento dei campioni d'acqua*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2013.
- UNI EN ISO 6341. *Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2013.
- UNI EN ISO 7899-2. *Ricerca ed enumerazione di Enterococchi intestinali - Metodo di Filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2003.
- UNI EN ISO 9308-1. *Ricerca ed enumerazione di E. coli e batteri coliformi. Metodo di Filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione: 2002.


US EPA. EPA Method 1600: membrane filter test method for enterococci in water. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2002. (EPA-821-R-02-022).



**APPENDICE A**  
**Questionario e protocolli analitici**



## A1. Questionario informativo



### RISPARMIO IDRICO

Nome e Ragione sociale

La tua risposta \_\_\_\_\_

Regione

Scegli ▾

Superficie aziendale

La tua risposta \_\_\_\_\_

Numero di stabilimenti

La tua risposta \_\_\_\_\_

Distretto idrografico

La tua risposta \_\_\_\_\_

Quale classe di dispositivo medico realizza?  
Classificazione CE - Allegato IX del D.lgs 46/97 e ss.mm.ii.

- Classe I s (basso rischio)
- Classe I m (basso rischio)
- Classe II a (medio rischio)
- Classe II b (rischio medio/alto)
- Classe III (alto rischio)

Quale tipologia di dispositivo medico realizza?

- Dispositivi ad uso oftalmico
- Dispositivi ad uso topico
- Dispositivi ad uso vaginale e rettale
- Dispositivi ad uso otorinolaringoiatrico
- Dispositivi intra-articolari ed intradermici
- Dispositivi per il trattamento di ferite e ulcere
- Dispositivi da ingerire
- Dispositivi per dialisi
- Dispositivi iniettabili
- Disinfettanti
- Altro: \_\_\_\_\_

Realizza Cosmetici?

- Sì
- No

Realizza Integratori?

- Sì
- No

Realizza Farmaci?

- Sì
- No

Realizza Biocidi?

- Sì
- No

Esiste una politica aziendale per la gestione sostenibile dell'acqua?

- Sì
- No

Se sì, quale?

La tua risposta

---

Che tipo di acqua viene utilizzata in ingresso al sistema di trattamento?

- Di rete
- Di pozzo
- Da fonte naturale superficiale (Lago)
- Da fonte naturale superficiale (Fiume)
- Altro: 

---

Qual è il sistema di tariffazione dell'acqua?

- Monomia
- Binomia
- A consumo
- Altro: 

---

Quanta acqua viene prelevata al giorno?

Valore medio

La tua risposta

---

Quanta acqua viene prelevata in un anno?

Valore medio

La tua risposta

---

Qual è il costo complessivo dell'acqua alla data di compilazione del questionario?  
Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

Qual è il costo di approvvigionamento dell'acqua alla data di compilazione del questionario?

Euro/anno (in base alla fonte: sollevamento, presa, opere varie di infrastrutturazione..)

La tua risposta \_\_\_\_\_

Quali sono i consumi e i costi energetici complessivi per l'elettricità?

TEP (Tonnellata Equivalente di Petrolio) e Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

Qual è il sistema di tariffazione dell'energia?

Multi oraria (fasce orarie F1-F2-F3)

Picco - fuori picco (2 fasce orarie)

Raramente monoraria

Altro: \_\_\_\_\_

L'approvvigionamento è sul

mercato libero

mercato tutelato

Se l'approvvigionamento è sul mercato tutelato, il tipo di servizio è

servizio di maggior tutela

servizio di salvaguardia

Quali sono i consumi e i costi energetici complessivi per il combustibile?

TEP (Tonnellata Equivalente di Petrolio) e Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

Quali sono i consumi e i costi energetici complessivi per i carburanti?

TEP (Tonnellata Equivalente di Petrolio) e Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

In che percentuale incide il costo dell'acqua sul bilancio dell'azienda?

La tua risposta \_\_\_\_\_

Vi sono dei costi energetici associati al ciclo idrico aziendale?

Sì

No

Se sì, quanta parte dei costi energetici è dovuta all'impiego dell'acqua nei processi industriali?

% e TEP (Tonnellata Equivalente di Petrolio)

La tua risposta \_\_\_\_\_

Sono state avviate azioni volte alla riduzione del consumo energetico connesso con l'uso di acqua?

Impianti rinnovabili (cogenerazione, ...)

Efficientamento impianti (ottimizzazione e riduzione sprechi)

Riutilizzo idrico (es per raffreddamento impianti)

Altro: \_\_\_\_\_

Quali sono i vantaggi e i risparmi conseguiti?

Risparmio Euro/anno, CO2 evitata, certificazioni (prodotto o processo), altro

La tua risposta \_\_\_\_\_

Personale dedicato alle attività di gestione degli impianti (dato annuo) e costi

Numero, costo Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

Qual è il costo di manutenzione ordinaria degli impianti?

Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

Qual è il costo di manutenzione straordinaria degli impianti?

Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

Quante manutenzioni straordinarie ha subito l'azienda negli ultimi 3 anni?

Numero

La tua risposta \_\_\_\_\_

Qual è la stima del costo dei trattamenti?

Costo Euro/anno, Euro/m3

La tua risposta \_\_\_\_\_

Quali sono i costi associati alla fase di scarico/smaltimento?

Costo Euro/anno

La tua risposta \_\_\_\_\_

Quali trattamenti vengono eseguiti sull'acqua all'interno dei processi industriali?

- Potabilizzazione
- Pretrattamento (addolcimento, dechlorazione, filtrazione, ecc.)
- Trattamento per acqua depurata (osmosi inversa, ultrafiltrazione, ecc.)
- Trattamento per acqua per preparazioni iniettabili
- Opzione 5
- Altro: \_\_\_\_\_

Come è usata/distribuita l'acqua?

Percentuali di utilizzo per i diversi scopi (produzione, lavaggio, ecc.)

La tua risposta \_\_\_\_\_



Esiste un programma di riutilizzo dell'acqua all'interno dell'azienda?

- Sì
- No

Se sì, per quale fase?

- Raffreddamento
- Lavaggio
- Altro: \_\_\_\_\_

Esiste un programma di riciclo dell'acqua di scarico?

- Sì
- No

Se no, qual è il destino dell'acqua di scarico?

- Viene scaricata tal quale
- Viene immessa direttamente nella rete di depurazione
- Viene trattata e poi immessa nella rete di depurazione
- Altro: \_\_\_\_\_

Se sì, per cosa è riciclata l'acqua?

- Scarico wc
- Agricoltura
- Altro: \_\_\_\_\_

Se sì, in che percentuale?

La tua risposta \_\_\_\_\_

Sono previste nell'azienda altre soluzioni per il risparmio dell'acqua?

- Sì
- No

Se sì, quali?


La tua risposta

---

Note

La tua risposta

---

**Invia**  Pagina 1 di 1

## A2. Protocolli per analisi microbiologiche

### A2.1. Protocollo per la determinazione di Enterococchi intestinali

**Scopo:** Rilevamento di Enterococchi intestinali

#### METODO DI ANALISI

##### Principio del metodo

L'isolamento ottimale di Enterococchi si ottiene con il metodo delle Membrane Filtranti (MF)

##### *Bibliografia di riferimento*

UNI EN ISO 7899-2:2003. Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di enterococchi intestinali - Metodo di filtrazione su membrana. Milano: Ente Nazionale di Unificazione; 2003.

Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21st Edition. Washington, DC: APHA; 2005.

##### Quantità di campione da analizzare

**100 mL**

è comunque in funzione della tipologia e della quantità dell'acqua da esaminare

**Fase di filtrazione.** 100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtro 0,45 µm di nitrocellulosa

##### Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

**Slanetz e Bartley (SB)**

37 ± 1°C per 44 ± 4 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo

##### Espressione dei risultati

Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione blu-verde sono contate e i risultati espressi in Unità Formanti Colonie in 100 mL:

**UFC / 100 mL**

La colorazione rosso-scuro è dovuta alla riduzione del 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride

##### Prove di conferma

Idrolisi dell'Esculina con il metodo classico o utilizzando test biochimici miniaturizzati API 20 NE

## A2.2. Protocollo per la determinazione di *Escherichia coli*

**Scopo:** Rilevamento di *Escherichia coli*

### METODO DI ANALISI

#### Principio del metodo

L'isolamento ottimale di *E. coli* si ottiene con il metodo delle Membrane Filtranti (MF)

#### Bibliografia di riferimento

UNI EN ISO 9308-1:2002. Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi - Metodo di filtrazione su membrana. Milano: Ente Nazionale di Unificazione; 2002.

Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21st Edition. Washington, DC: APHA; 2005.

#### Quantità di campione da analizzare

**100 mL**

è comunque in funzione della tipologia e della quantità dell'acqua da esaminare

**Fase di filtrazione.** 100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtro 0,45 µm di nitrocellulosa

#### Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

**Tryptone, Bile salts, agar, X-Gluc (TBX)**

44 ± 1°C per 18÷24 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo

#### Espressione dei risultati

Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione blu-verde sono contate e i risultati espressi in Unità Formanti Colonie in 100 mL:

**UFC / 100 mL**

La colorazione delle colonie è dovuta alla capacità ematica di *E. coli*. avviene una reazione idrolitica ad opera dell'enzima β-glucuronidasi e del cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D glucuronide (X-Gluc) presente nel terreno.

#### Prove di conferma

Verifica del citocromo ossidasi e produzione di indolo con i metodi classici o utilizzando test biochimici miniaturizzati API 20E

#### Conservazione dei campioni

Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20°C)

## A2.3. Protocollo per la determinazione del conteggio delle colonie su Agar a 22°C e 37°C

**Scopo:** Rilevamento di Colonie Totali (CBT)

### METODO DI ANALISI

#### Principio del metodo

L'isolamento ottimale di Colonie Totali (Conta Batterica Totale, CBT) si ottiene con il metodo di Inclusione

#### *Bibliografia di riferimento*

European Pharmacopoeia 6.0:

2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products (total viable aerobic count)

2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products (test for specified micro-organisms)

5.1.4. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use

5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality

Farmacopea ufficiale della Repubblica italiana. - 9. ed. 1985.

Suppl 1 1988 Requisiti microbiologici delle preparazioni farmaceutiche

#### Quantità di campione da analizzare

1 mL

#### Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

##### R2A Agar

22 ± 1°C per 64÷72 ore e 37 ± 1°C per 40÷48 ore

L'incubazione a 22 ± 1°C per acque molto pulite fino 120÷144 ore.

#### Espressione dei risultati

Dopo l'incubazione contare tutte le colonie, per ciascuna temperatura, con un sistema di ingrandimento su sfondo scuro e scartare quelle a crescita confluyente:

**N / mL**

## A2.4. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Pseudomonas* spp.

**Scopo:** Rilevamento di *Pseudomonas* spp.

### METODO DI ANALISI

#### Principio del metodo

L'isolamento ottimale di *Pseudomonas* spp. si ottiene con il metodo delle Membrane Filtranti (MF)

#### Bibliografia di riferimento

ISO 16266:2006. Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* — Method by membrane filtration. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.

#### Quantità di campione da analizzare

**250 mL**

**Fase di filtrazione.** 250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtro 0,45 µm di nitrocellulosa

#### Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

**CN agar**

42 ± 1°C per 48 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo

#### Espressione dei risultati

Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione nerastra sono contate tenendo conto della suddivisione delle colonie nere con e senza alone

**UFC / mL**

#### Prove di conferma

Ossidasi secondo i metodi classici.

#### Conservazione dei campioni

Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20°C)

## A2.5. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Staphylococcus spp.*

**Scopo:** Rilevamento di *Staphylococcus spp.*

### METODO DI ANALISI

#### Principio del metodo

L'isolamento ottimale di *Staphylococcus aureus* si ottiene con il metodo delle Membrane Filtranti (MF)

#### Bibliografia di riferimento

US EPA. Method 1600: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus Indoxyl- $\beta$ -D-Glucoside Agar (mEI). Washington, DC: EPA; 2002. EPA-821-R-02-022.

#### Quantità di campione da analizzare

**250 mL**

**Fase di filtrazione.** 250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtro 0,45  $\mu$ m di nitrocellulosa

#### Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

**Agar Baird Parker (BP Agar)**

37  $\pm$  1°C per 48 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo

#### Espressione dei risultati

Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione nerastra sono contate tenendo conto della suddivisione delle colonie nere con e senza alone

**UFC / mL**

#### Prove di conferma

Coagulasi e catalasi secondo i metodi classici.

#### Conservazione dei campioni

Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20°C)

## A3. Protocolli dei test ecotossicologici

### A3.1. Protocollo: test acuto con il batterio *Vibrio fischeri*

Il test di tossicità acuta di *Vibrio fischeri* (UNI EN ISO 11348-3) si basa sulla naturale capacità di questo batterio marino, di emettere luce in condizioni ottimali, una diminuzione della bioluminescenza è quindi attribuibile ad effetti tossici del campione/sostanza/miscela che viene testato.

In questo studio è stato utilizzato il sistema automatizzato Microtox Analyzer 500 (Modern Water) con i batteri congelati di *Vibrio fischeri* ceppo NRRL B-11177 (conservati a -20°C). Microtox® M500 è un fotometro da laboratorio a temperatura controllata per la misura di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* dotato di pozzetti termostatati a 15°C per i controlli e i campioni da analizzare, e a 5°C per la riattivazione dei batteri

L'inibizione della bioluminescenza viene misurata effettuando le letture dopo esposizione di 5, 15 e 30 minuti dei batteri al campione da analizzare. Il test prevede la lettura di 4 repliche di campione, 4 repliche di controllo negativo e 2 repliche di una sostanza tossica di riferimento, tra quelle indicate dalla ISO, come il K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. La tossicità del campione è stabilita attraverso l'effetto inibitore (Ht) che questo ha sui batteri e viene espressa attraverso la percentuale di inibizione.

Il volume di campione necessario per il saggio è di circa 6 mL. Per poter svolgere il test, il campione deve avere pH compreso tra 6,0 e 8,5, qualora non lo sia, aggiustarlo con di NaOH o HCl; in tale caso effettuare il test sul campione corretto e sul campione iniziale. Deve essere misurato l'Ossigeno Disciolto: quest'ultimo deve essere superiore a 3 mg/L. Qualora sia inferiore arieggiare il campione, fino a raggiungere tale concentrazione. Se si tratta di campioni d'acqua dolce è necessario aggiungere al campione una quantità equivalente di NaCl tale da ottenere una salinità pari al 20‰.

All'inizio di ogni test, la sospensione contenente i batteri deve essere riattivata utilizzando una specifica soluzione ricostituente e lasciandola a temperatura di 5°C per 30 minuti.

La sospensione batterica può essere utilizzata nelle tre ore successive alla riattivazione, pertanto è possibile allestire più test con lo stesso batch di batteri.

### A3.2. Protocollo: test acuto con il crostaceo *Daphnia magna*

Il test "Determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* (UNI EN ISO 6341:2013) prevede l'esposizione di dafnidi giovani appartenenti alla specie del crostaceo cladocero *Daphnia magna* per 48 ore al fine di valutare la tossicità acuta di una sostanza attraverso il conteggio degli organismi immobili.

Per lo svolgimento di tutti i test si possono utilizzare uova durature "efippi" purché sia garantita la qualità degli organismi, le condizioni di allevamento e produzione facendo riferimento strettamente ai protocolli standardizzati prescritti dalla norma.

Prima dell'inizio del saggio è prevista l'incubazione degli efippi in una piastra contenente una soluzione standard, per circa 80 ore a 21±2°C e con illuminazione continua di 6000 lux, al termine di tale periodo si ottengono organismi giovani detti "dafnidi" da utilizzare nell'allestimento delle prove di tossicità.

Due ore prima dell'inizio del test, per garantire agli organismi una riserva energetica e precluderne la morte per carenza di cibo, si aggiunge una sospensione di micro alga *Spirulina* come *uptake* di cibo.

Il saggio è condotto in piastre multi-pozzetto, in ogni pozzetto vengono trasferiti 10 mL di campione e cinque dafnidi. Per ogni campione si preparano 5 concentrazioni ciascuna suddivisa in 4 repliche, quindi per ciascuna concentrazione vengono esposti 20 dafnidi con età inferiore alle 24 ore. Il sistema multi-pozzetto viene quindi posto incubato in condizioni controllate: 21±2°C, al buio, per 48 ore.

I risultati (in termini di immobilità degli organismi) registrati a 48 ore, riportati in percentuale (100\*n/20), vengono confrontati con il controllo negativo (mezzo di crescita per l'organismo) e con un controllo positivo, preparato con il tossico di riferimento (bicromato di potassio) a conferma dell'idoneità del mezzo di crescita e degli organismi utilizzati. Affinché il test sia considerato valido, devono essere rispettati i seguenti criteri di validità:

- nel controllo negativo, non più del 10% degli individui devono essere immobilizzati;
- la concentrazione di ossigeno disciolto alla fine del test deve essere > 3 mg/L nel controllo e nei pozzetti del test.



### A3.3. Protocollo: test con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Il test di inibizione della crescita algale consiste nell'esposizione di una popolazione dell'alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, in fase esponenziale di crescita, al campione in esame. La procedura in dettaglio viene descritta nella linea guida OCSE 201/2011 "Alghe d'acqua dolce e cianobatteri, test di inibizione della crescita e nella norma UNI EN ISO 8692 "Test di inibizione della crescita delle acque algali di acqua dolce con alghe verdi unicellulari".

Si procede con la preparazione di 5 diluizioni seriali 1:2 del campione (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%) e a ciascun campione si aggiungono 1mL di  $10^6$  cell/mL della sospensione algale in modo da ottenere una concentrazione algale iniziale  $i$  di  $10^4$  cell/mL. Per una valutazione statistica significativa ogni concentrazione del campione e del controllo viene ripetuta in tre repliche. La concentrazione delle cellule algali viene determinata prendendo letture ogni 24 ore, con uno spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 670 nm.

La misurazione della crescita delle alghe viene effettuata dopo 24 ore, 48 ore e 72 ore di incubazione, in condizioni controllate di luce (10000 lux se la luce proviene dai lati, 3000-4000 lux se la luce proviene dal basso), temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e con una specifica quantità di nutrienti. L'endpoint del test è l'inibizione della crescita, espressa come aumento logaritmico della biomassa (tasso di crescita specifico medio) durante il periodo di esposizione. L'inibizione percentuale del tasso di crescita per ciascuno dei campioni è stata calcolata con l'equazione:

$$\% Ir = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

dove % Ir: inibizione percentuale media;  
 $\mu_c$ : tasso di crescita medio specifico per il controllo;  
 $\mu_T$ : tasso di crescita specifico medio per ogni replica del campione.

### A3.4. Protocollo: test di fitotossicità con la monocotiledone (*Sorghum saccharatum*)

Il saggio con le piante è stato condotto con la specie *Sorghum saccharatum*. Gli effetti sono stati valutati confrontando l'indice di germinazione del campione rispetto al controllo. L'indice di germinazione tiene conto di due endpoint: la germinazione dei semi e la crescita delle plantule. Il test viene condotto in piastre piatte e trasparenti divise in due parti, nella parte inferiore viene posizionato uno strato di spugna, un foglio assorbente imbevuto di 20 L di ciascuna delle 5 concentrazioni del campione in esame, sul quale vengono sistemati 10 semi ad una distanza uguale l'uno dall'altro e in prossimità della parte centrale della piastra dove si individua un solco longitudinale predisposto. Per ciascuna concentrazione si allestiscono tre repliche, per un totale di 15 piastre a campione, che vengono incubate verticalmente alla temperatura di  $25^\circ\text{C}$  per tre giorni al buio. Alla fine del periodo di incubazione, vengono effettuate foto digitali in cui sono chiaramente visibili i germogli e le radici in virtù della trasparenza delle piastre. Attraverso il test di fitotossicità si possono misurare due effetti principali delle plantule esposte rispetto al controllo negativo di quelle non esposte:

- l'accrescimento del germoglio
- l'accrescimento radicale

Le misurazioni della lunghezza dei germogli e delle radici possono essere effettuate utilizzando appositi software. Il calcolo delle percentuali di effetto si esegue attraverso tre passaggi successivi:

- si calcola la media di semi germogliati nelle tre repliche del controllo e in ciascuna delle 5 concentrazioni del campione;
- si calcola la media della lunghezza delle radici e dei germogli nelle tre repliche del controllo;
- si calcola la percentuale dell'effetto del campione, alle diverse concentrazioni, sulla crescita del germoglio e delle radici, con la seguente formula:

$$\frac{(A-B)}{A} \times 100$$

dove A: media della lunghezza delle radici e la media della lunghezza dei germogli per le 3 repliche del controllo

B: media della lunghezza delle radici e la media della lunghezza dei germogli per le 3 repliche di ciascuna delle cinque concentrazioni

### A3.5. Protocollo: test del micronucleo sulla pianta *Vicia faba* (MN test)

*Vicia faba*, varietà minore comunemente chiamata “favino”, è stata selezionata per l’MN test. I semi di *Vicia faba*, conservati in un luogo fresco e asciutto e al riparo dalla luce, sono stati preparati per l’esposizione a campioni a partire dalla fase di germinazione dei semi essiccati. I semi sono stati reidratati per 24 ore, sciacquati accuratamente e posizionati su un substrato di argilla sintetica mescolato con acqua di rubinetto; la germinazione è stata effettuata a  $+20 \pm 1^\circ\text{C}$ , al buio con il 100% di umidità per 4-5 giorni. Quando la lunghezza della radice primaria ha raggiunto 1-2 cm, i semi sono stati rimossi e le parti apicali delle radici primarie sono state tagliate per una produzione di radice secondaria più veloce, che sono state quindi esposte ai campioni al buio. Sono stati studiati quattro tempi di esposizione: un breve intervallo di 4 ore, seguito da 20 ore in acqua di rubinetto, 4 ore seguite da 68 ore in acqua di rubinetto di recupero, 24 ore e 72 ore di esposizione al campione. Alla fine del trattamento, le radici secondarie sono state rimosse e fissate in una miscela di acido acetico-etanolo 1: 4. L’acqua del rubinetto è stata utilizzata come controllo negativo. Il trattamento di controllo positivo è stato eseguito anche con idrazide maleica 10-4 M (11,2 mg/L) in acqua di rubinetto (trattamento di 4 ore + recupero di 68 ore). È stata eseguita la colorazione Feulgen delle radici e le punte tagliate sono state schiacciate su vetrini in acido acetico al 45% e montate permanentemente in Eukitt. Al fine di evitare la sottostima della frequenza del micronucleo a causa della ridotta velocità di proliferazione cellulare, il test del micronucleo è stato eseguito solo su gli apici radicali con un indice mitotico compreso tra il 2% e il 12%. L’indice mitotico è stato stimato su 1000 cellule / punta e la frequenza del micronucleo è stata determinata in 10.000 cellule per campione, analizzando 1000 cellule per apice radicali, 10 apici radicali / punto sperimentale. L’analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il test non parametrico di Mann-Whitney (media  $\pm$  errore standard). Il test t di Student è stato utilizzato per determinare differenze significative tra ciascun punto sperimentale e controllo a livello di significatività 0,01 (valore p).

### A3.6. Protocollo: test acuto con embrioni di pesce *Danio rerio*

Attraverso l’impiego del “Fish Embryo Toxicity Acute (FET) test” (OECD 236) si può misurare la tossicità acuta sugli stadi embrionali del pesce *Danio rerio*, a partire dalle uova allo stadio di divisione di 16 cellule. Per l’allevamento degli organismi riproduttori, sono stati scelti acquari da 60 litri facilmente reperibili in commercio, equipaggiati con circa 30 individui ciascuno in rapporto di 2 maschi per ogni femmina. Poiché la deposizione delle uova avviene alle prime ore del giorno, gli acquari sono stati posti in una camera climatizzata al buio e collegati ad un temporizzatore per l’accensione delle lampade in modo da stimolare la deposizione e il prelievo delle uova in “trappole” adeguate e all’orario più idoneo per l’operatore. L’alimentazione seguita e le caratteristiche dell’acqua di mantenimento sono descritte in dettaglio nella norma OECD 236. Affinché il test sia considerato valido, il tasso di fecondazione delle uova raccolte deve essere maggiore del 70%, la percentuale di sopravvivenza nel controllo negativo (acqua di allevamento) deve essere maggiore del 90% e infine nel controllo positivo (soluzione di 4 mg/L di 3,4-dicloroanilina) la mortalità misurata deve essere maggiore del 30% alla fine delle 96 ore. Il test deve iniziare entro 90 minuti dalla fecondazione delle uova. Tra le uova fecondate vengono selezionate al microscopio quelle allo stadio di 16/32 cellule blastomeriche, immediatamente pre-esposte ponendole in capsule di Petri contenenti ciascuna i campioni da testare e il controllo negativo. Successivamente le uova vengono trasferite in piastre multi pozzetto, in particolare ciascun pozzetto contiene 2 mL di campione e un uovo. Le piastre così allestite sono incubate in condizioni controllate di luce e temperatura a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . È previsto la preparazione di un controllo positivo per ogni gruppo di uova utilizzate, con il tossico di riferimento 3,4-dicloroanilina (3,4 DCA) alla concentrazione unica di 4 mg/L. Eventuali malformazioni dell’embrione vengono registrate attraverso l’osservazione ogni 24 ore di 4 distinti endpoint: 1. *coagulazione dell’embrione*: può verificarsi anche entro poche ore dall’inizio dell’esposizione e indica un effetto tossico acuto generico; 2. *manca di formazione del somite*: il somite dovrebbe essere visibile dopo 12 ore dalla fecondazione; se assente, l’embrione non si svilupperà ulteriormente determinandone quindi la morte; 3. *manca distacco della coda*: il distacco della coda dal tuorlo si osserva dopo 24 ore dalla fecondazione, indicando la normale crescita dell’embrione; 4. *assenza di battito cardiaco*: il battito è facilmente rilevabile dopo 30 ore dalla fecondazione, la sua assenza indica la morte dell’embrione. Al termine del periodo di esposizione di 96 ore, la tossicità acuta è determinata sulla base di un risultato positivo di una delle quattro osservazioni apicali registrate. Inoltre, le linee guida suggeriscono di registrare quotidianamente eventuali anomalie morfologiche e fisiologiche degli embrioni a partire da 48 ore, al fine di acquisire una stima degli effetti subletali, aggiungendo così importanti informazioni sulle sostanze presenti nel campione.

*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di dicembre 2020, 10° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, dicembre 2020*