

RAPPORTO DI PROVA PER L'ANALISI DI CAMPIONI DI ROCCIA MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM) ASSOCIATA ALLA MICROANALISI IN DISPERSIONE DI ENERGIA (EDS)

INTRODUZIONE:

Il campione da analizzare (costituito da **una coppia di lastre di serpentinite**, di dimensioni 11 x 5 x 1 cm circa) è stato consegnato mediante Corriere Espresso al Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio e di Scienze della Terra dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca in una scatola di cartone, in data **04/12/2015**. Le indagini analitiche sono state eseguite nel periodo compreso tra il **07/12/2015** ed il **24/02/2016**. Nella sottostante Tabella 1 viene riportato l'aspetto macroscopico e la descrizione petrografica del campione.

Tabella 1: aspetto macroscopico e provenienza del campione.

Denominazione campione	Aspetto macroscopico e provenienza
"Agnisci"	Coppia di lastre di serpentinoscisto proveniente dal polo estrattivo Agnisci – Chiesa in Valmalenco (SO). Superfici a spacco naturale.

Lo scopo della presente indagine analitica mediante microscopia elettronica a scansione (SEM, *scanning electron microscopy*) associata alla microanalisi in dispersione di energia (EDS, *energy dispersive spectroscopy*) è la caratterizzazione morfologica e chimica delle eventuali fibre, con particolare riguardo alla ricerca e alla quantificazione di **fibre di amianto** di serpentino e/o anfibolo (ai sensi del D.M. 06.09.94 e del D.M. 14 maggio 1996 "Pietre Verdi", con determinazione dell'indice di rilascio "I.R."), le varietà asbestiformi dei seguenti minerali:

Crisotilo	$Mg_3Si_2O_5(OH)_4$	n. CAS 12001-29-5
Tremolite	$Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$	n. CAS 77536-68-6
Actinolite	$Ca_2(Mg, Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$	n. CAS 77536-66-4
Antofillite	$(Mg, Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$	n. CAS 77536-67-5
Grunerite (amosite)	$(Fe, Mg)_7Si_8O_{22}(OH)_2$	n. CAS 12172-73-5
Riebeckite (crocidolite)	$Na_2(Mg, Fe)_6Si_8O_{22}(OH)_2$	n. CAS 12001-28-4

In Tabella 2 sono riportati il tipo di strumentazione utilizzata (Fig. 1) e le condizioni analitiche.

Tabella 2: strumentazione e condizioni analitiche.

<p>Strumentazione utilizzata</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopio elettronico a scansione Vega TS Tescan, Univac 5163 XM; • analizzatore a dispersione di energia EDAX Genesis 4000 XMS Imaging 60 SEM; • metallizzatore: CARBON COATER Edwards 5150B.
<p>Condizioni analitiche</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tensione di esercizio: 20 kV; • distanza del campione: 23 mm (EDS) – 10 mm (immagini SE-BSE); • osservazione a 160 - 124000 ingrandimenti; • conteggio a 2000 ingrandimenti; • acquisizione di immagini in elettroni secondari (SE) e retrodiffusi (BSE); • acquisizione di spettri EDS rappresentativi (tempo di conteggio 100 s).



Figura 2: microscopio elettronico a scansione Vega TS Tescan Univac 5163 XM con analizzatore a dispersione di energia EDAX Genesis 4000 XMS Imaging 60 SEM, in dotazione presso il Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio e di Scienze della Terra dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

La preparazione del campione può essere riassunta come segue:

- le lastre di roccia sono state seccate in stufa a 105 °C per 2 ore, fino a peso costante, per eliminare le tracce di umidità;
- le lastre sono state sottoposte ad una procedura di abrasione meccanica reciproca ("automacinazione"), come indicato dal D.M. 14 maggio 1996 "Pietre Verdi";
- la polvere ottenuta dall'automacinazione è stata dapprima vagliata con un setaccio a maglia di 1.6 mm, successivamente quartata, ed in seguito ulteriormente macinata a mano in un mortaio d'agata per circa due minuti, in bagno di acetone (per ridurre l'amorfizzazione delle eventuali fibre presenti);
- circa 8 g di polvere sono stati messi in bagno d'acetone e trattati con ultrasuoni. La soluzione è stata poi asciugata in forno a 60 °C, e la polvere passata al setaccio 125 µm, per eliminare frammenti di maggiori dimensioni;
- circa 10 mg della polvere ottenuta dalla setacciatura sono stati dispersi in 200 ml di acqua distillata e filtrata contenente 0.2 ml di tensioattivo (*Diocetyl sodium sulfosuccinate*, $C_{20}H_{37}NaO_7S$, CAS n. 577-11-7), mescolati e trattati con ultrasuoni per 5 minuti;
- senza lasciare decantare la soluzione, 3 x 2.5 ml della stessa sono stati prelevati da 3 diversi livelli del becher, dal fondo, dalla superficie e in mezzo, per un totale di 7.5 ml di soluzione;
- la soluzione è stata filtrata attraverso una membrana in policarbonato (diametro 25 mm) con porosità 0.6 µm con l'ausilio di una buretta messa in depressione e di un imbuto su cui è stata adagiata la membrana;
- la membrana con il suo carico di sospensione è stata poi seccata in stufa a 50 °C e pesata con una bilancia analitica di precisione;
- la membrana è stata infine montata su uno stub in Al con l'ausilio di un biadesivo conduttivo e metallizzata con grafite (Fig. 2). È stata scelta la metallizzazione con grafite (invece che con Au) per ottenere migliori risultati dalle microanalisi in dispersione di energia (EDS).

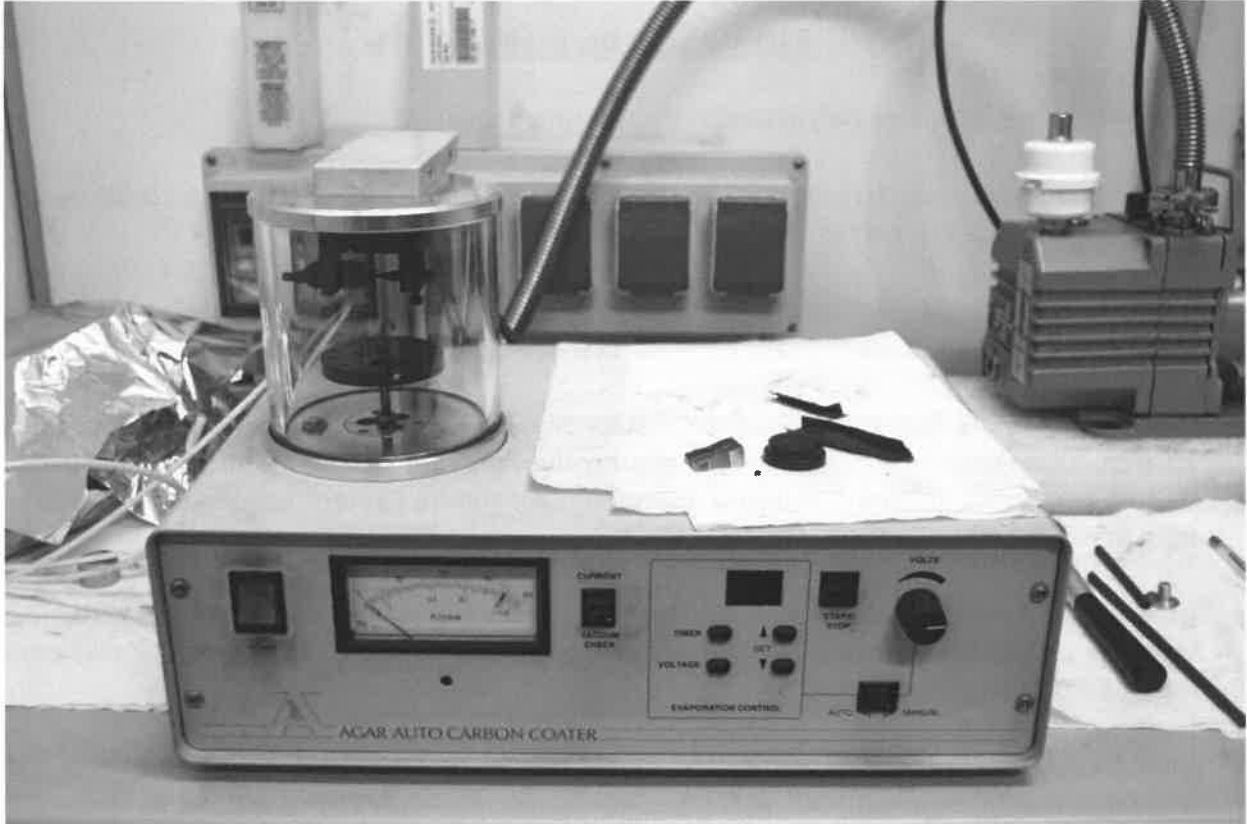


Figura 2: metallizzatore a grafite CARBON COATER Edwards 5150B, in dotazione presso il Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio e di Scienze della Terra dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca.

RISULTATI

Considerazioni generali

È stata analizzata mediante SEM-EDS una membrana in policarbonato, e sono stati esaminati a schermo 40 campi a 2000 ingrandimenti (superficie di ogni campo pari a $26570 \mu\text{m}^2$), pari ad una superficie esaminata di 1.0628 mm^2 . Il diametro della macchia di polvere sulle membrane è pari a 21.85 mm , per una superficie di 375 mm^2 . Le indagini preliminari, volte ad identificare la presenza di fibre di amianto, hanno fornito i seguenti risultati:

- campione "Agnisci": amianto ASSENTE (nessuna fibra in 40 campi microscopici a 2000X).

Sono state acquisite immagini rappresentative, sia in modalità elettroni secondari (SE, *secondary electrons*), sia in modalità elettroni retrodiffusi (BSE, *back scattered electrons*). La composizione chimica delle particelle è stata analizzata mediante microanalisi in dispersione di energia EDS (*energy-dispersive spectroscopy*).

Particolare attenzione è stata posta sulla presenza, il numero, la dimensione e la composizione chimica delle fibre. Il volume di ogni singola fibra viene approssimata a quella di un cilindro, ed il peso calcolato assumendo una densità media di **2.6 g/cm³** per il **crisotilo** e **3.0 g/cm³** per l'**anfipolo**. La concentrazione **C** delle fibre viene espressa in mg/kg (ppm) e calcolata come segue:

$$C = \left[A \frac{(w_c + w_a)}{n a W} \right] 10^6$$

C = concentrazione delle fibre (mg/kg = ppm);
A = superficie del filtro (mm²);
w_c = peso totale delle fibre di crisotilo;
w_a = peso totale delle fibre di anfipolo;
n = numero dei campi esaminati;
a = superficie del singolo campo esaminato (mm²);
W = peso del campione sul filtro (mg).

Gli errori sperimentali sono soprattutto funzione della statistica di conteggio al SEM-EDS e della distribuzione dimensionale granulometrica delle fibre ottenuta durante le fasi di frantumazione e macinazione. Con un numero relativamente ridotto di fibre, con $n_{ff} < 30$ la media e la deviazione standard della distribuzione dimensionale granulometrica non sono significativi, per cui non è possibile calcolare il relativo errore. Viene pertanto riportato esclusivamente l'errore legato alla statistica di conteggio **1σ**: assumendo una distribuzione di Poisson delle fibre sulla membrana, l'errore **1σ** = $\left(\frac{\Delta N}{N}\right)$ viene calcolato come **1σ** = $\frac{1}{\sqrt{N}}$.

I criteri morfologici e dimensionali utilizzati per la distinzione dei polimorfi asbestiformi (es. crisotilo) da quelli non fibrosi (es. antigorite/lizardite) sono quelli indicati dalla letteratura scientifica internazionale più aggiornata [1 - 10].

In particolare, è di fondamentale importanza distinguere tra le cosiddette fibre "respirabili" (con rapporto L/D>3, D<3 μm e L>5 μm) le "vere" fibre di amianto (crisotilo e/o anfipoli asbestiformi) dalle particelle pseudo-fibrose di serpentino lamellare (antigorite e/o lizardite) e dalle comuni varietà aciculari/prismatiche di anfipolo. Di seguito, vengono elencati i criteri morfologici e dimensionali per la distinzione tra crisotilo e pseudo-fibre di serpentino lamellare.

1. **Pseudo-fibre di serpentino lamellare** (prevalentemente antigorite, talvolta lizardite): presenta abito da lamellare ad aciculare (**pseudo – fibroso**), ad andamento rettilineo, con superfici di sfaldatura piano-parallele, terminazioni nette, diametro $> 0.2 - 0.3 \mu\text{m}$ (in genere $> 0.5 - 0.6 \mu\text{m}$), la cui composizione e morfologia è compatibile con quella di frammenti aciculari, pseudo - fibrosi di **serpentino lamellare** $\text{Mg}_3(\text{OH})_4\text{Si}_2\text{O}_5$. Non si evidenziano mai fibrille/fasci di fibrille e/o terminazioni sfrangiate. La corretta distinzione di questi frammenti pseudo-fibrosi di serpentino lamellare (in senso geometrico e "normativo") è spesso possibile solo mediante osservazioni ad elevato ingrandimento (fino a 118000 X). Questi polimorfi lamellari del serpentino **non** sono considerati amianti: pur presentando una composizione chimica (rilevabile in EDS) identica al crisotilo (rapporto Mg/Si, tracce di Al e Fe), non hanno le tipiche caratteristiche asbestiformi (fibrille, fasci di fibrille, etc). I frammenti pseudo-fibrosi di serpentino lamellare sono generalmente più abbondanti sulle membrane derivanti da lavorazioni delle varietà più scistose del Serpentino (serpentinoscisto), ove i cristalli di serpentino presentano un'elevata *aspect-ratio* imputabile al *fabric* milonitico (elevato grado di deformazione duttile). Per una classificazione affidabile di alcune fibre particolarmente problematiche (dimensioni ridotte, sovrapposizione di particelle), sarebbe tuttavia necessario il ricorso ad approfondimenti condotti con altre tecniche analitiche (TEM, *transmission electron microscopy*, associato alla diffrazione elettronica, SAED *selected area electron diffraction pattern*). Dal punto di vista chimico (microanalisi EDS e/o WDS) il crisotilo ha un contenuto $\text{Mg} + \text{Si} > 39.5\%$ e $\text{Al} + \text{Fe} + \text{Mn} + \text{Cr} < 1.5\%$, mentre l'antigorite presenta un maggiore contenuto di $\text{Al} + \text{Fe} + \text{Mn} + \text{Cr}$, con $\text{Mg} + \text{Si} < 39.5\%$. Esiste tuttavia una sovrapposizione tra le composizioni chimiche dei due polimorfi, nonché una notevole variabilità naturale in funzione della provenienza dei campioni. La sola analisi chimica non è un elemento sufficiente e sicuro per la discriminazione dei polimorfi.

2. **Crisotilo**: rispetto al serpentino lamellare, le fibre di **crisotilo** $\text{Mg}_3(\text{OH})_4\text{Si}_2\text{O}_5$ presentano sezione e "sfaldatura cilindrica", andamento irregolare, curvilineo, terminazioni sfrangiate, diametro $< 0.2 \mu\text{m}$, e spesso si rinvencono in fasci di fibrille. Come evidenziato da Cattaneo et al., 2012 [1] e da Cavallo & Rimoldi, 2013 [2], è possibile distinguere le fibrille di crisotilo dalle pseudo-fibre di serpentino lamellare in base a criteri morfologici (Fig. 3) e di diametro di *cut-off* (pari a $0.25 \mu\text{m}$, Fig. 4). Il crisotilo si rinviene in genere sotto forma di fibrille isolate, talvolta in fasci di fibrille. Occasionalmente, le singole fibrille risultano adese su aggregati di particelle.

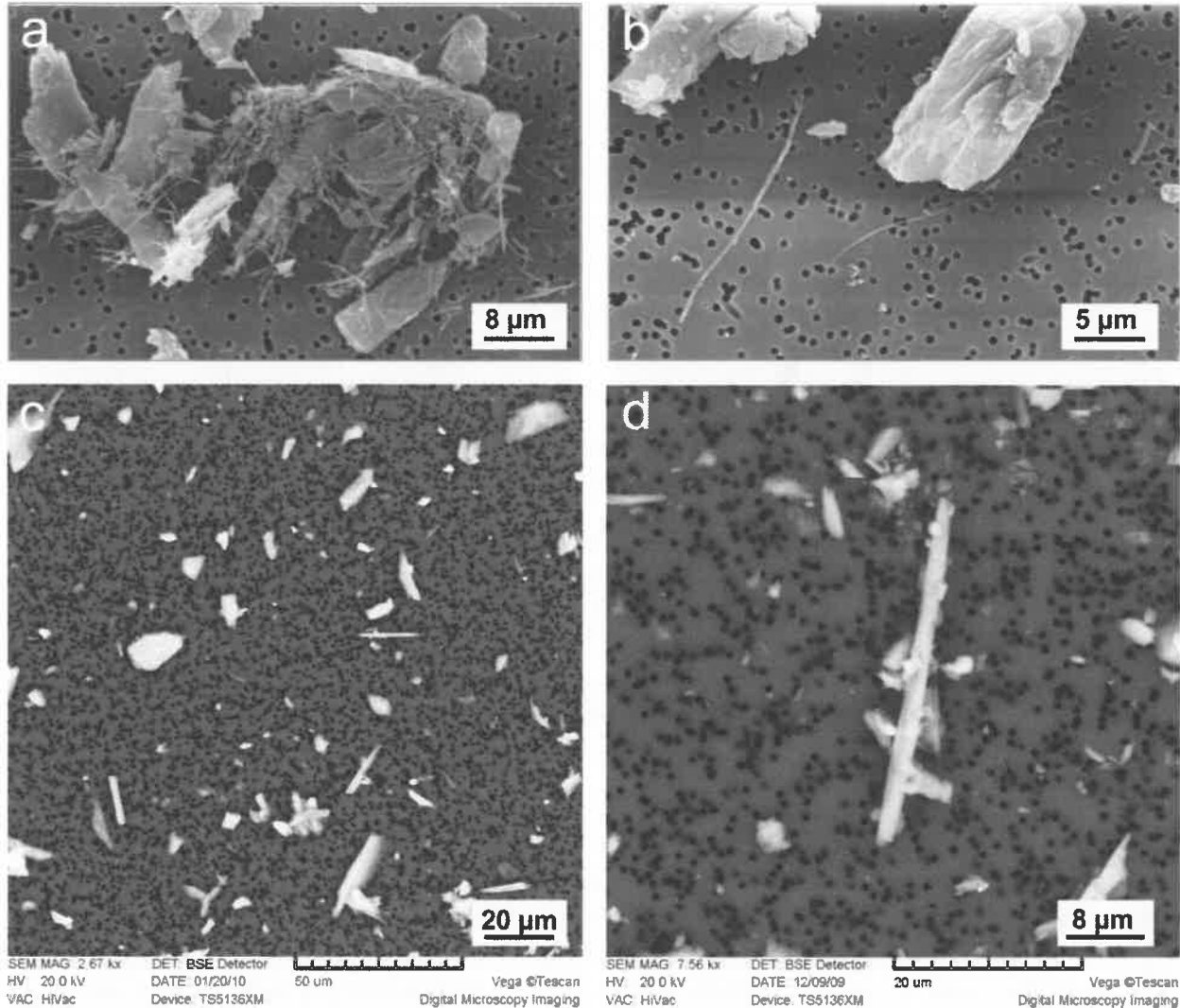


Figura 3: differenze morfologiche tra fibrille di crisotilo (a-b) e frammenti aciculari, pseudo - fibrosi (c-d) di serpentino lamellare (antigorite), riscontrati su membrane in policarbonato derivanti da campionamenti di particolato aerodisperso in cave di serpentinite. Da Cavallo & Rimoldi, 2013 [2].

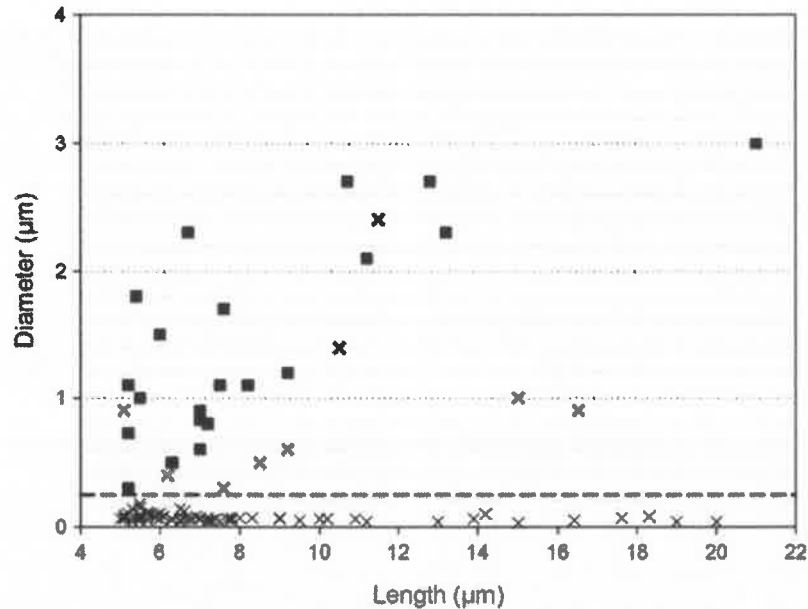


Fig. 4. TEM dimensional analysis of airborne serpentine WHO fibres. Thin crosses = chrysotile fibrils, thick crosses = chrysotile bundles, and black squares = antigorite fibres. The dashed line shows the width threshold that separates the chrysotile single fibre region from the antigorite single fibre region.

Figura 4: diametro di *cut-off* per la distinzione tra fibrille di crisotile e frammenti aciculari, pseudo - fibrosi di serpentino lamellare (antigorite), riscontrati su membrane in policarbonato derivanti da campionamenti di particolato aerodisperso in cave di serpentinite. Da Cattaneo et al., 2012 [1].

La trattazione dell'amianto in contesti "naturali" (NOA – *naturally occurring asbestos*) è un argomento assai complesso, non confrontabile con i contesti industriali e/o di bonifica, per via della presenza dei **polimorfi non asbestiformi** (es. antigorite e lizardite, nel caso del serpentino), ovvero di minerali che presentano esattamente la stessa composizione chimica delle comuni varietà di amianto, **senza tuttavia avere abito asbestiforme** (requisito essenziale per la definizione di amianto). Questa peculiarità non si riscontra mai in contesti industriali e in manufatti contenenti amianto, in quanto i polimorfi non asbestiformi non vengono utilizzati, non avendo le caratteristiche fisiche e tecniche richieste (es. filabilità, resistenza alla trazione, suddivisione in fasci di fibrille). Riguardo la pericolosità dei **polimorfi non asbestiformi**, esiste un'ampia letteratura scientifica per la distinzione di fibre asbestiformi da frammenti pseudo - fibrosi (*cleavage fragments*), con differenze sostanziali riguardo la **citotossicità** (non presente nell'ultimo caso).

Fasi mineralogiche riscontrate

Nella sottostante Tabella 3 vengono elencate in ordine di abbondanza le principali fasi mineralogiche riscontrate nel campione.

Tabella 3: fasi mineralogiche riscontrate nel campione di serpentinite "Agnisci".

Campione	Fasi mineralogiche	Abbondanza relativa
"Agnisci"	serpentino (antigorite) $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$;	++
	olivina $(Mg, Fe)_2SiO_4$;	O
	clorite $(Mg, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn, Al)_{12}[(Si, Al)_8O_{20}](OH)_{16}$;	O/-
	pirosseno (diopside) $(Ca, Na)(Mg, Fe^{+2}, Al)(Si, Al)_2O_6$;	-
	magnetite $(Fe, Mg)Fe_2O_4$;	-
	cromite $(Fe, Mg)(Cr, Al)_2O_4$;	-
	brucite $Mg(OH)_2$;	-
	solfori di Fe, Ni e Cu ;	--
	ilmenite $FeTiO_3$;	--
leghe metalliche (Fe-Ni, Cu nativo).	--	

++ = molto abbondante (> 25 wt.%)

+ = abbondante (10 – 25 wt.%)

O = presente (2 – 10 wt.%)

- = tracce (0.5 - 2 wt. %)

-- = tracce minime (\leq 0.5 wt.%)

Analisi delle fibre

Amianto di serpentino:

Non sono state evidenziate fibre di minerali riferibili all'amianto di serpentino (**crisotilo** $Mg_3(OH)_4Si_2O_5$). I criteri utilizzati per la distinzione dei polimorfi lamellari (antigorite/lizardite) da quelli asbestiformi (crisotilo) sono quelli indicati dalla letteratura scientifica internazionale più recente [1 - 10].

Sono state riscontrate grandi quantità di **serpentino lamellare** (prevalentemente antigorite, rara lizardite), proveniente dai clasti serpentinitici, talvolta sotto forma di frammenti aciculari, pseudo - fibrosi di **serpentino lamellare (antigorite/lizardite)**, che rispettano i criteri dimensionali/geometrici di "fibra" ($L > 5\mu m$, $\varnothing < 3\mu m$, $L/\varnothing > 3$) e composizionali (rapporto Mg/Si in EDS). Tuttavia, da un attento esame ad elevato ingrandimento, risulta che questi frammenti pseudo - fibrosi sono il prodotto della frantumazione e macinazione di serpentino lamellare (*cleavage fragments*). Questi **polimorfi lamellari** del serpentino (antigorite/lizardite) **non** sono considerati amianti: pur presentando una composizione chimica identica al crisotilo, non hanno le tipiche caratteristiche asbestiformi (presenza di fibrille, fasci di fibrille, diametro della singola fibrilla $< 0.3 \mu m$, ecc.). Per una distinzione certa dei polimorfi, sarebbe tuttavia necessario l'uso di altre tecniche analitiche (TEM-SAED, *transmission electron microscopy – selected area electron diffraction*).

Amianti di anfibolo:

Non sono state rilevate fibre riferibili ad amianto di anfibolo (tremolite, actinolite, antofillite, grunerite, riebeckite).

Concentrazioni di amianto ed indice di rilascio

Nella Tabella 4 viene riportato il contenuto estrapolato di amianto in peso dei campioni ed il relativo indice di rilascio (I.R.). Per il calcolo dell'I.R. (indice di rilascio) viene considerato un valore di % di densità relativa pari al 90%, come da letteratura scientifica [3, 7].

Si ricorda che per le rocce ad uso ornamentale, lavorate in lastre, il limite di legge indicato dal D.M. 14 maggio 1996 "Pietre Verdi" è **I.R. < 0.1**.

Per maggiore chiarezza e completezza, e considerando la definizione "controversa" dell'indice di rilascio (vedi note), **viene indicato anche il valore espresso in ppm (mg/kg)**. Per terre e rocce da scavo, il valore limite è pari a **1000 ppm (0.1% in peso)**.

Tabella 4: concentrazione estrapolata in peso ed indice di rilascio.

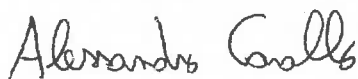
Campione	Concentrazione estrapolata (mg/kg = ppm)			Indice di rilascio*
	Amianto di serpentino (1σ) [n. fibre]	Amianto di anfibolo (1σ) [n. fibre]	Totale amianto (1σ) [n. fibre]	
"Agnisci"	< I.r.#[0]	< I.r.#[0]	< I.r.#[0]	I.R. < 0.01

- # I.r. = limite di rilevabilità, pari a circa 50 - 100 ppm.
- 1σ è l'errore legato esclusivamente alla statistica di conteggio.
- * I.R. = *indice di rilascio*, definito come $I.R. = \frac{\% \text{ di amianto liberata}}{\% \text{ densità relativa}}$, mentre la % *densità relativa* è definita come $\frac{\text{densità apparente}}{\text{densità assoluta}}$. La definizione di *indice di rilascio* riportata nel D.M. 1996 è "anomala", in quanto è evidente che o manca un "%" nella definizione di densità relativa, oppure c'è un "%" in più nella formula dell'I.R. È evidente che la soglia indicata dal D.M. è inadatta allo scopo, e va drasticamente abbassata. Sarebbe sufficiente per esempio definire l'I.R. = % *amianto liberata* (mg/kg, come proposto ad esempio dall'ARPA della Regione Emilia Romagna), togliendo così il denominatore che, essendo uguale o prossimo al 100%, diminuisce automaticamente il valore dell'I.R. di 100 volte. Per il calcolo dell'I.R. viene considerato un valore di % di densità relativa pari al 90%.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] A. CATTANEO, A. SOMIGLIANA, M. GEMMI, F. BERNABEO, D. SAVOCA, D.M. CAVALLO, P.A. BERTAZZI (2012) - *Airborne Concentrations of Chrysotile Asbestos in Serpentine Quarries and Stone Processing Facilities in Valmalenco, Italy*, Ann. Occup. Hyg. **56/6**, 671-683.
- [2] A. CAVALLO, B. RIMOLDI (2013) - *Chrysotile asbestos in serpentinite quarries: a case study in Valmalenco, Central Alps, northern Italy*, Environ. Sci: Processes Impacts **15/7**, 1341-1350.
- [3] A.F. GUALTIERI, S. POLLASTRI, N. BURSI GANDOLFI, F. RONCHETTI, C. ALBONICO, A. CAVALLO, G. ZANETTI, P. MARINI, O. SALA (2014) - *Determination of the concentration of asbestos minerals in highly contaminated mine tailings: An example from abandoned mine waste of Crètaz and Èmarese (Valle d'Aosta, Italy)*. Am. Mineral., **99**, 1233 – 1247.
- [4] ISO (2002) - *Ambient air—determination of numerical concentration of inorganic fibrous particles—scanning electron microscopy method 14966*, International Standard Organization Geneva, Switzerland.
- [5] M.E. GUNTER (2010) - *Defining asbestos: Differences between the built and natural environments*, Chimia **64**, 747–752.
- [6] R.J. LEE, B.R. STROHMEIER, K.L. BUNKER, D.R. VAN ORDEN (2008) - *Naturally occurring asbestos - A recurring public policy challenge*, J. Haz. Mat. **153**, 1–21.
- [7] NIOSH – DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2011) - *Asbestos Fibers and Other Elongate Mineral Particles: State of the Science and Roadmap for Research. Revised Edition*. DHHS (NIOSH) Publication No. **2011–159**.
- [8] S. POLLASTRI, A. F. GUALTIERI, M. LASSINANTI GUALTIERI, M. HANUSKOVA, A. CAVALLO, & G. GAUDINO (2014) - *The zeta potential of mineral fibres*. J. Haz. Mat., **276**, 469 – 479.
- [9] H.C.K. SKINNER (2003) - *Mineralogy of asbestos minerals*, Indoor Built Environ. **12**, 385–389.
- [10] D.R. VAN ORDEN, K.A. ALLISON, R.J. LEE (2008) - *Differentiating amphibole asbestos from non-asbestos in a complex mineral environment*, Indoor Built Environ. **17**, 58–68.

Il responsabile scientifico della prestazione conto terzi



Dr. Alessandro Cavallo (Ph.D.) - Researcher
Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio e di Scienze della Terra
Sezione di Scienze Geologiche e Geotecnologie
Università degli Studi di Milano-Bicocca
Piazza della Scienza, 4
I – 20126 Milano
Phone +39-02-6448-2027
Fax +39-02-6448-2073
Mobile +39-338-2343834
e-mail alessandro.cavallo@unimib.it
<http://www.unimib.it/go/Home/Italiano/Elenco-Docenti/cavallo-alessandro>