

# SESSIONE 3

## APPROCCIO MULTIPLO IN ECOTOSSICOLOGIA

### Module 2- Model out put for bioavallability data processing

**Bioavallability**

ID: 4509  
 Area name: Sedimento Industriale  
 Site code: exp1  
 Sampling code: K37  
 Sample code: d  
 Species: Anguilla\_anguilla  
 Tissue / organ: Gills  
 Experimental condition: Laboratory\_sediment  
 Control / exposed: Exposed

N° param in class 1 (hazard ABSENT): 11  
 N° param in class 2 (hazard SLIGHT): 4  
 N° param in class 3 (hazard MODERATE): 3  
 N° param in class 4 (hazard MAIOR): 2  
 N° param in class 5 (hazard SEVERE): 4  
 Bioavallability HQ: 145,5523  
 Level of hazard for bioavallability: MAIOR

Process 1 Process 2

ID	Area name	Site code	Sampling	Sample code	Species	Tissue / organ	Experimental condition	Control / exposed
4499	Marina di...	pontile interno	K37	a	Mytilus galloprovincialis	Gills	Transplanted	Reference area
4501	Marina di...	pontile interno	K37	b	Mytilus galloprovincialis	Gills	Transplanted	Investigated area
4503	sito cont...	b	K37	a	Mytilus galloprovincialis	Gills	Transplanted	Reference area
4505	Marina di...	pontile interno	K37	g	Mytilus galloprovincialis	Liver, dig gland	Transplanted	Investigated area
4507	sito cont...	d	K37	a	Mytilus galloprovincialis	Liver, dig gland	Transplanted	Reference area
4509	Sedim...	exp1	K37	d	Anguilla_anguilla			
4511	sedim...	a	K37	d	Anguilla_anguilla			
4513	Sedim...	exp1	K37	d	Mullus_spp			
4515	sedim...	a	K37	d	Mullus_spp			

**Annotations:**

- n. of parameters in each of the 5 classes of hazard
- cumulative HQ value
- class of hazard for bioavallability
- wild specimens
- caged organism
- laboratory exposure

**Species Images:** Mytilus galloprovincialis, Tapes philippinarum, Hediste diversicolor, Anguilla anguilla

# Batterie per saggi ecotossicologici su sedimenti di acque di transizione e marine costiere

R. Baudo

CNR – Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Verbania – [r.baudo@ise.cnr.it](mailto:r.baudo@ise.cnr.it)

**Riassunto – Verrà illustrata l'attività di una commissione di studio UNICHIM costituita allo scopo di redigere un documento sulla applicazione di batterie di saggi ecotossicologici per l'esame di sedimenti marini e delle acque di transizione.**

**Parole chiave:** ecotossicologia dei sedimenti

## INTRODUZIONE

Nell'ambito della Commissione UNICHIM Qualità dell'acqua, Gruppo di Lavoro Metodi Biologici, Sottogruppo Acque salate/salmastre e sedimenti, è stato costituito un Gruppo *ad hoc* "Batterie, scale di tossicità e indici integrati" (Coordinatore: Dr. Renato Baudo) del quale fanno parte i Coordinatori dei Gruppi *ad hoc* "Batteri", "Algae", "Rotiferi", "Molluschi", "Policheti", "Crostei", "Echinodermi", "Pesci", "Biomarkers", "Biocenosi bentoniche", "Campionamento, matrici e ambienti".

Il Gruppo *ad hoc* "Batterie, scale di tossicità e indici integrati" ha avuto, come mandato, il compito di valutare, attraverso un esame critico della bibliografia internazionale e nazionale esistente, nonché dell'attività dei vari Gruppi *ad hoc*, la possibilità di costituire una o più batterie di saggi ecotossicologici che consentano di effettuare una valutazione ecotossicologica, tramite saggi di tossicità, dei sedimenti delle acque marine costiere e di transizione.

Tali batterie di saggi verranno quindi proposte alla comunità scientifica italiana per un loro possibile utilizzo nell'ambito di programmi di monitoraggio della qualità delle acque marine costiere e di transizione.

L'attività del gruppo *ad hoc* ha portato alla redazione di un documento, composto di 5 parti.

### Parte 1 - Criteri di identificazione delle batterie

Un approfondito esame della letteratura scientifica ha permesso di identificare un possibile approccio per la identificazione di batterie di saggi ecotossicologici differenziate in funzione del tipo di ambiente sul quale verrà effettuata l'indagine e dell'obiettivo prefissato. Infatti, le diverse combinazioni ambiente – obiettivo determinano i requisiti che la batteria di saggi ecotossicologici deve avere per quanto concerne matrici, organismi ed endpoint da utilizzare.

I possibili ambienti dovranno essere considerati in funzione delle caratteristiche ambientali generali e rientrare tra le aree di transizione o costiere, distinte per il tipo di substrato (duro, sabbioso-ghiaioso, fangoso, misto).

Le batterie devono essere identificate soprattutto in funzione del loro utilizzo di routine. Ad esempio, vanno privilegiati gli organismi allevabili, oppure facilmente reperibili per vie commerciali indipendentemente dal

periodo stagionale (acquaculture e/o laboratori che commercializzano le specie di interesse, anche in forma di Toxkit). Per il requisito della praticità (specie allevabili e/o reperibili in commercio) sarebbe auspicabile che fossero creati degli "allevamenti centralizzati", in grado di fornire il materiale biologico a richiesta. Va però tenuto presente che l'adozione di specie allevabili, ma alloctone, potrebbe richiedere una autorizzazione e certamente, se venisse ravvisata l'esigenza di inserire una tale specie in una batteria, andranno indicate le opportune avvertenze per evitare l'introduzione nell'ambiente di una specie alloctona.

Poiché non è pensabile chiedere che ciascun laboratorio mantenga un numero molto elevato di allevamenti diversi, si deve cercare anche di contenere il più possibile il numero di saggi da includere in una batteria, pur mantenendo allo stesso tempo una buona copertura per sensibilità e rilevanza ecologica (tutte le batterie devono includono almeno batteri, alghe e invertebrati e prevedere la rilevazione di endpoint diversi, non solo letali).

Sempre pensando alla routine, le differenze tra batterie in funzione dell'ambiente e del substrato vanno limitate all'essenziale, anche se è evidente che sarà necessario tener conto delle esigenze degli organismi in funzione della salinità e del substrato.

Ancora privilegiando l'utilizzo di routine, per i vari saggi preferibilmente andranno proposti sistemi statici, o al massimo semi-statici (con rinnovo periodico del mezzo acquoso), perché i sistemi a flusso continuo decisamente non sono alla portata di tutti i laboratori.

Per scelta, il gruppo di lavoro non ha preso in considerazione i biomarker, considerandoli allo stato attuale non proponibili per batterie di routine, anche in considerazione di alcuni aspetti negativi e delle difficoltà di interpretazione in chiave ecosistemica. Ciò non toglie che, tra le raccomandazioni, quando necessario si possa indicare anche la necessità di affiancare i saggi di tossicità con studi sulla composizione quali- quantitativa del benthos, di bioaccumulo, di biomarker.

Sulla base dei criteri così identificati, il gruppo *ad hoc* ha successivamente elaborato un metodo di valutazione delle batterie di saggi ecotossicologici che teoricamente potrebbero essere proposte.

Tale metodo viene proposto e discusso nella Parte 2 del documento finale.

### Parte 2 - Criteri di giudizio per la valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi biologici

In ecotossicologia è ormai accettato il principio che la potenziale tossicità di un materiale di prova (naturale e/o sintetico) possa essere accertata solo utilizzando una batteria di saggi ecotossicologici, poiché nessun singolo modello sperimentale è in grado di garantire in assoluto, da

solo, l'attendibilità dei risultati per tutte le possibili tipologie di matrici e/o sostanze.

Resta, quindi, il problema di verificare quale batteria di saggi ecotossicologici sia effettivamente in grado di rispondere alle esigenze, in particolare considerando requisiti di scientificità e praticità: infatti, se da un lato è necessario garantire che i saggi biologici che compongono la batteria abbiano solide basi conoscitive sull'ecologia strutturale e funzionale dei modelli sperimentali proposti, dall'altro è indispensabile contenerne numero e complessità entro limiti ragionevoli, compatibili con una applicazione di routine.

Pertanto, al gruppo *ad hoc* "Batterie, scale di tossicità e indici integrati" è stato affidato il compito di identificare i criteri di giudizio sui quali basare una valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi ecotossicologici, così da consentire un confronto tra batterie già in uso e nuove batterie che, ipoteticamente, potrebbero essere proposte per conseguire obiettivi di salvaguardia ambientale di vario tipo.

In questo documento, che riporta le conclusioni concordate tra i partecipanti ai lavori, vengono quindi descritte due metodologie distinte concernenti i criteri per la ponderazione esperta di alcuni fattori che, a giudizio del gruppo *ad hoc*, concorrono alla valutazione della valenza "ecologico - scientifica" e di "praticità - fruibilità" di batterie di saggi ecotossicologici, in funzione del tipo di ambiente e della applicazione.

Il gruppo *ad hoc* "Batterie, scale di tossicità e indici integrati", sulla base dei criteri di valutazione identificati, ritiene che sia possibile giungere ad una valutazione obiettiva della validità scientifica e pratica di una batteria di saggi di ecotossicità, reale o ipotetica, mediante l'opportuna ponderazione di numerosi parametri che caratterizzano i possibili saggi biologici.

Per una corretta applicazione è necessario effettuare separatamente due tipi di calcoli: il primo consente di calcolare una "rilevanza scientifica", il secondo una rilevanza pratica". La ponderazione "scientifica" viene proposta come utile strumento per valutare l'attendibilità di una batteria di saggi ecotossicologici da applicare per ricerche e approfondimenti sito - specifici; la ponderazione alternativa "pratica" privilegia un approccio per un uso di routine. Il confronto sistematico di entrambe le ponderazioni indica, quindi, quanto la rilevanza scientifica penalizza la praticità o, in alternativa, quanto la praticità fa perdere in rilevanza. Combinandole assieme, si ha infine una valutazione "scientifico - pratica".

Ovviamente, la doppia ponderazione può essere anche utilizzata per ipotizzare diverse batterie alternative, per cercare la combinazione che massimizza sia la rilevanza che la praticità, nell'ottica di cercare un compromesso che aumenta la rilevanza scientifica, senza penalizzare eccessivamente la rilevanza pratica.

### **Parte 3 - Identificazione degli organismi ed endpoint**

Sulla base dei criteri identificati nella Parte 1, è stata esaminata criticamente la bibliografia esistente, nonché le esperienze originali di ricerca dei componenti dei singoli gruppi *ad hoc* per arrivare ad identificare e proporre, nell'ambito dei diversi gruppi di organismi, i saggi

ecotossicologici che rispecchiano i requisiti per una loro potenziale inclusione in batterie per sedimenti di acque di transizione e marine costiere.

A tale scopo, per ciascun saggio viene identificato il tipo di prova (secondo la classificazione della Parte 1), l'organismo, la matrice utilizzata, l'endpoint, la durata dell'esposizione, l'obiettivo per il quale può essere proposto ed il riferimento bibliografico per il protocollo metodologico.

Quale ulteriore elemento di giudizio, per ciascuno dei saggi proposti vengono inoltre attribuiti i fattori di ponderazione necessari per valutare obiettivamente la valenza scientifica e pratica delle batterie che teoricamente possono essere costituite combinando opportunamente i saggi di organismi appartenenti a diversi livelli trofici. I criteri ed i fattori numerici di ponderazione sono stati dettagliatamente discussi nella Parte 2 del documento.

### **Parte 4 – Composizione e valutazione delle batterie**

Sulla base delle valutazioni espresse dai coordinatori dei Gruppi *ad hoc* "Batteri", "Alghe", "Rotiferi", "Molluschi", "Policheti", "Crostacei", "Echinodermi", "Pesci", "Biomarker", "Biocenosi bentoniche", "Campionamento, matrici e ambienti", ed in particolare dei fattori di ponderazione attribuiti ai singoli saggi ecotossicologici basati su organismi appartenenti a diversi livelli trofici (Parte 3), è stato possibile applicare il metodo descritto nella Parte 2 per valutare obiettivamente la valenza scientifica e pratica delle batterie che teoricamente possono essere costituite per uno studio dei sedimenti delle acque di transizione e marine costiere.

Sono state quindi ipotizzate e confrontate diverse tipologie di batterie, ciascuna delle quali composte da un minimo di 3 saggi ecotossicologici, per ciascuna delle applicazioni possibili identificate nella Parte 1.

Le combinazioni illustrate rappresentano solo alcune di quelle possibili, scelte in modo tale da massimizzare la varietà di organismi ed endpoint. Quando, per lo stesso tipo di saggio, esistono delle alternative, generalmente viene preferito il saggio con il punteggio più elevato di valenza ecologica e/o pratica.

### **Parte 5 – Scale di tossicità e indici integrati**

A conclusione del lavoro, è stata esplorata la possibilità di stabilire una scala di tossicità da applicare ai saggi ecotossicologici che compongono una batteria, indipendentemente dal loro numero e tipo, e di formulare, se possibile, un indice sintetico che cumuli i giudizi indipendentemente espressi sulla base dei singoli saggi di ecotossicità che compongono una batteria.

Innanzitutto, va ricordato che il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, predisposto dal Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e recante Norme in materia ambientale, nell'Allegato 5 (Limiti di emissione degli scarichi idrici) alla parte Terza, Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche, dispone che per la valutazione dello stato ecologico sono obbligatori i saggi di tossicità acuta e che "in caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il caso peggiore".

L'approccio ha una ovvia limitazione: la scelta automatica del caso peggiore, che è estremamente conservativa e non consente nemmeno un giudizio esperto basato sul weight of

evidence. Sarebbe invece auspicabile sviluppare un indice che consenta di integrare le informazioni ottenute con i singoli saggi, tenendo conto del tipo di tossicità rilevata, e che permetta di mediare tra risultati spesso discordanti ed a volte anche contraddittori: non è infrequente, infatti, osservare che il risultato di un saggio indichi assenza di tossicità, mentre altri saggi rilevino una tossicità di grado diverso.

L'indice proposto prevede di applicare gli appropriati fattori di ponderazione, per ciascuno dei saggi che costituiscono una batteria, ai seguenti parametri:

- Severità della risposta, in funzione del tipo di effetto misurato;
- Grado della risposta, in percentuale rispetto al valore medio del rispettivo controllo negativo, indipendentemente dalla significatività statistica;
- Variabilità della risposta, espressa dal coefficiente di variazione tra repliche dello stesso saggio.

Ovviamente, severità, risposta e variabilità sono caratteristiche del saggio per lo specifico campione.

L'indice considera inoltre il numero di endpoint considerati complessivamente nella batteria e la consistenza, che esprime il grado di accordo tra i vari endpoint: è alta se tutti i test concordano, ed è quindi alta anche la fiducia di poter identificare una situazione di rischio; la consistenza però diminuisce se i risultati sono contraddittori o conflittuali, e quindi diminuisce anche la fiducia di identificare correttamente il grado di rischio.

Infine, viene introdotto anche un correttivo per le matrici sulle quali vengono condotti i saggi e che hanno una diversa rilevanza ai fini dell'interpretazione dei risultati di una batteria.

## CONCLUSIONI

Con questo documento il gruppo *ad hoc* ritiene di aver assolto il compito che gli era stato affidato, identificando i criteri di composizione di batterie di saggi biologici che consentano di effettuare una valutazione ecotossicologica dei sedimenti delle acque marine costiere e di transizione, in funzione delle diverse tipologie delle indagini.

Va precisato che le indicazioni emerse da questo gruppo *ad hoc* non hanno e non possono avere validità di protocolli vincolanti. Solo una eventuale adozione da parte delle Autorità competenti (ISPRA, UNICHIM, altre) conferirà loro la necessaria ufficialità.

Tuttavia, il documento fornisce elementi sufficienti per "giudicare", e quindi confrontare in maniera obiettiva, attraverso la ponderazione esperta di alcuni fattori, la valenza di qualunque batteria di saggi biologici, in termini di rappresentatività ecologica e/o praticità di realizzazione e/o applicazione.

Fornisce inoltre numerosi esempi di batterie che potrebbero essere utilizzate per indagini ecotossicologiche specifiche per determinati ambienti e per diversi obiettivi (salvaguardia degli ambienti, monitoraggio di routine, recupero di ambienti contaminati, ecc.)

Infine, l'indice sintetico elaborato consente di integrare i risultati ottenuti con una batteria di saggi ecotossicologici e può essere applicato a qualsiasi batteria, indipendentemente dal numero e tipo di endpoint considerati, permettendo di calcolare in modo obiettivo tossicità e potenziale rischio di un campione, espressi in una scala arbitraria ma che corrisponde ad un "giudizio esperto" condiviso dai partecipanti al gruppo *ad hoc*.

Ovviamente, questo indice va inteso solo come uno strumento di lavoro e non pretende di sostituirsi alla valutazione critica espressa dall'utilizzatore.

Le diverse parti del documento "Batterie per saggi ecotossicologici su sedimenti di acque di transizione e marine costiere" sono attualmente in via di pubblicazione sul sito web di ISPRA.

In funzione degli ulteriori contributi e dei commenti dei lettori, il Gruppo *ad hoc* si assume fin da ora l'impegno ad aggiornare periodicamente il documento; è infatti prevedibile che, in futuro, alcuni saggi possano rimpiazzare o affiancare i saggi attualmente inseriti nelle batterie, se in tal modo dovesse significativamente migliorare la valenza scientifica e/o pratica delle batterie proposte.

## RINGRAZIAMENTI

Con questa presentazione si coglie l'occasione di ringraziare i partecipanti ai lavori, più di cento esperti italiani che operano nel settore ed hanno profuso il loro impegno in sei anni di discussioni per consentire la redazione del documento qui brevemente illustrato.

# Assessing sediment hazard through a Weight Of Evidence approach: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and bioassays

F. Onorati<sup>a</sup>, F. Regoli<sup>b</sup>, F. Ciaprini<sup>a</sup>, F. Piva<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Roma, Italy) – fulvio.onorati@isprambiente.it

<sup>b</sup> Dipartimento di Biochimica, Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

**Abstract – Following a multidisciplinary, Weight-Of-Evidence approach, a new model is presented here for comprehensive assessment of hazards associated to polluted sediments.**

**The Lines Of Evidence considered were sediment chemistry, assessment of bioavailability, sublethal effects on biomarkers, and ecotoxicological bioassays. Each LOE summarises the data into four specific synthetic indices, prior to overall hazard evaluation.**

**A conceptual and software-assisted model was developed to elaborate these LOEs within and among individual modules.**

**The model shows a greater ability to realistically assess the level of hazard associated with potential impacts of contaminated marine and brackish matrices.**

**Keywords:** Hazard, Weigh Of Evidence, synthetic indices.

## 1. INTRODUCTION

The characterization of contaminated marine sediments is of crucial ecological and toxicological importance. This can also have economic implications (Chapman et al., 2002), since political decisions on management choices are greatly influenced by the technical assessment of their quality and the associated risks. Nonetheless, the definition of sediment quality can be highly controversial. Chemical characterization by itself does not provide specific biological information about potential hazards to organisms (Chapman, 2007).

The transfer of contaminants from sediments to biota is obviously a necessary requisite for toxicity to occur, but bioaccumulation dynamics of contaminated sediments is still an area of active research (McCarty et al., 2002).

Laboratory bioassays are a common procedure to evaluate toxicological endpoints at organism level, in a large number of test species from across several taxa, and across the main ecological or trophic positions (i.e. from bacteria to fish, and from decomposers to final consumers).

The status of resident communities is another typical target of investigations into the impact of pollution in specific areas.

A more comprehensive evaluation of sediment quality should also include sub-lethal, long-term effects of any released contaminants. Alterations at the molecular and cellular levels (biomarkers) can provide a sensitive indication of early changes, which often represent the first warning signals of environmental disturbance (Galloway et al., 2004; McCarty et al., 2002), even in the absence of acutely toxic responses.

The aim of the present work is to provide a contribution to the multidisciplinary assessment of sediment quality and subsequent hazard, improving the traditional system based on a Weight of Evidence (WOE) approach.

In particular, a mechanisms of integration of data from four different Lines Of Evidence (LOEs) was developed:

1. chemical characterization of sediments;
2. assessment of pollutants bioavailability (bioaccumulation);
3. sub-lethal effects on biomarkers;
4. ecotoxicological bioassays.

Each of LOE should allow processing of different types of data, providing specific hazard estimates through the use of synthetic indices.

A conceptual and software-assisted WOE model was developed to elaborate these LOEs within individual modules, with each considering several chemical and biological parameters, normative guidelines, and/or scientific evidence. This allowed summarizing of the data into four specific synthetic indices, which are finally integrated into an overall evaluation of hazard associated to sediments.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 General structure of the model

The model was based on four independent LOEs, each of which provided synthetic indices that were finally integrated into a WOE evaluation (Fig. 1).

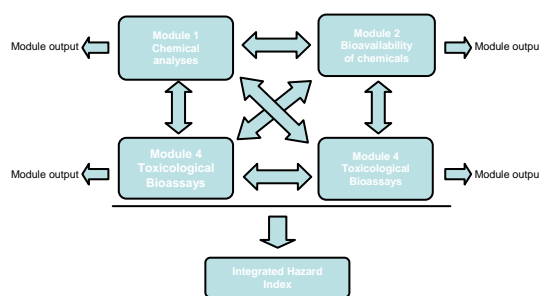


Figure 1. General structure of evaluation model.

The integration of information occurs on two levels: within each module, providing an estimate of the specific hazard for the type of data set and corresponding to each LOE (Module output); and among the different modules, thus obtaining an estimate of total hazard (Integrated Hazard Index).

Conceptual elaborations of the data were converted in a specific software, using Structured Query Language (SQL) and Visual Basic, called Sediqualeft<sup>®</sup>.

## 2.2 Criteria for data processing

Starting from the most suitable definition of Ecological Risk Assessment (ERA) as a “*Systematic process for collecting, organizing, and analyzing information to estimate the likelihood of undesired effect on nonhuman organisms, population, or ecosystems and to formulate remedial decision*” (Suter, 1993), the LOE used and converted in the SediquaSoft<sup>®</sup> software have the following structure.

### - Module 1: sediment chemistry

Module 1 evaluates the hazard associated with the presence of chemical contaminants in sediments.

As this can be strongly influenced by the choice of regulation reference, it was deemed necessary that the module consider all major national and international legislations currently in force, as well as the main international SQGs, which are generally based on statistical procedures associating chemical data to the occurrence of biological effects.

The chemical hazard should be assessed not only in relation to the presence of parameters that exceed the reference limit, but also in relation to the type of contaminant.

In order to introduce a qualitative element to the estimation of chemical hazards, this study has implemented a set of coefficients that depend on the specific hazard of the substance, according to classification found in EU Directive 105/2009/CE for the 105 *Hazardous* and *Priority & Hazardous* substances. These coefficients allow the differentiated weighting of the contribution of each substance to the overall chemical risk. The evaluation of chemical hazard also takes into account both the number of parameters that are not compliant with the reference considered and the extent of the non-compliance.

Furthermore, it also provides additional information useful for a rapid comprehension of the chemical hazard, in particular the number of contaminants that do not conform, and the percentage contribution value of the parameter that most contributes to the chemical hazard assessment.

In Figure 2 an example of model output for sediment chemistry is showed.

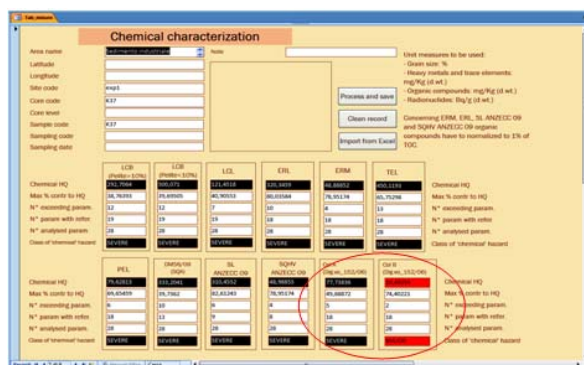


Figure 2. Model output for sediment chemistry data processing (Module 1).

### - Module 2: bioavailability

The objective for Module 2 was to develop a conceptual model able to assess the hazard associated with the bioavailability of contaminants in sediments.

The list of chemical parameters considered in the module is the same as that for Module 1, but in this case there is no standardized references to compare concentrations detected in the tissues of exposed organisms. The evaluation process

must therefore be based on the comparison against control samples.

An important feature of this module is that, in evaluating the bioavailability of contaminants, it should take into account the differences in data obtained from many target species (both vertebrates and invertebrates, including those most commonly used as bioindicators as per the relevant literature).

The module should also consider that for the same species, indications will be given on bioavailability in different organs and tissues and contingent on exposure conditions.

As with Module 1, the evaluation process is based on several factors such as the type of bioaccumulated parameter (*Priority Hazardous* and *Hazardous*), the number of bioaccumulated parameters, and the magnitude of bioaccumulation in terms of the ratio between the concentrations found in tissues of the exposed organisms and that in control organisms.

In the evaluation process consideration is also given to the natural variability in bioaccumulation processes, as these can be associated with fluctuations of both environmental factors and relating to the physiological conditions of the organism.

A tolerance threshold was therefore introduced, marking the point beyond which the difference between pollutant concentrations found in the tissues of exposed organisms and that of controls could be attributed to the actual presence of contaminants in the sediment and their bioavailability.

This tolerance threshold is one of the main differences with regards to the integration method used in Module 1 where the chemical hazard stems from whether a specific chemical limit is exceeded or not.

In Figure 3 an example of model output for bioavailability evaluation is showed.



Figure 3. Model output for bioavailability data processing (Module 2).

### - Module 3: biomarkers

Module 3 calculates a hazard index assessing early sub-lethal biological effects in organisms (biomarkers) induced by sediment contaminants.

There are no standardised references, then the evaluation process is based on the comparison for each biomarker between the effects measured in exposed organisms versus controls.

The evaluation of each sample takes into account various information, including the target species used, the type of biomarker, the tissue analysed, and the experimental conditions.

Depending on these variables, it is possible to obtain varied information on the type of stress taking place and in some

cases the category of pollutants responsible for the measured effects.

In this respect, a score is attached to each biomarker depending on the biological effect detected and the mechanistic knowledge available. The score's function is to differentiate responses that constitute signals of greater danger (e.g. DNA damage, imposex, histopathology, etc.) from those that are perhaps more precocious, but less severe (e.g. HSP, metallothioneins, metabolites, etc.).

In regards to the kind of specie and the type of tissue, a variation threshold for each biomarker was determined (inhibition or stimulation), beyond which the measured effect is deemed no longer attributable to natural physiological variability, but rather to stress induced by external causes (such as the presence of contaminants affecting the health of the organism). This threshold should also take into account the possible biphasic responses of certain biomarkers that can be both induced and inhibited.

For the evaluation process, the biomarker hazard index model takes into consideration the type and biological relevance of the responses analysed, the magnitude of thresholds exceeded, and the statistical significance of the variations from controls.

In Figure 4 an example of model output for biomarkers data processing is showed.

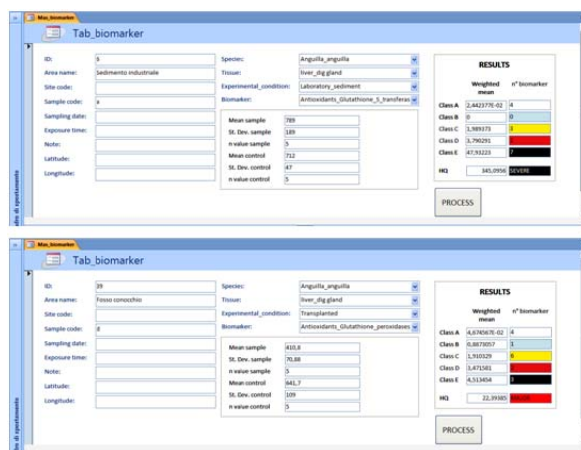


Figure 4. Model output for biomarkers data processing (Module 3).

#### - Module 4: bioassays

Module 4 addresses hazard evaluation using batteries of ecotoxicological assays.

The basis of the evaluation process is the comparison between toxic effects measured in organisms exposed to sediment (or related matrices – pore water, elutriates, etc.) compared to effects measured in control conditions.

As in Modules 2 and 3, this module must also consider factors such as the test specie used (selected from an extensive list of species from different trophic levels for which there are standardised and/or approved methodological procedures by Agencies or International Organisations), the exposure matrix, the type of endpoints measured, and the duration of the exposure.

Depending on the factors listed, a score is assigned based on the severity of the biological effect measured (the endpoint – ranging from simple behavioural changes to the death of the organism), on the duration of exposure (from acute or short-term to chronic or long-term), and on the

environmental representativeness of the matrix tested (elutriate, pore water, etc.).

As with other modules, to each bioassay a toxicity threshold is associated, beyond which the measured effects are considered biologically relevant and due to contamination rather than to natural variability.

The module needs to allow the integration of the results from the different assays that make up the bioassay battery, thus providing an integrated ecotoxicological hazard index.

In Figure 5 an example of model output for bioassays data processing is showed.

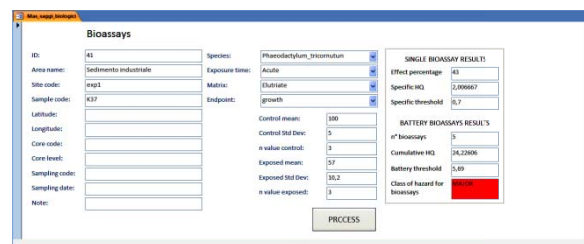


Figure 5. Model output for bioassays data processing (Module 4).

#### - The integrated WOE Assessment

The final aim of the model was to process the overall data obtained from the individual LOEs within a quantitative WOE approach that considered sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and the battery of bioassays.

To aggregate the data from the different LOEs and determine an overall hazard, individual hazard indices were normalised to a common scale and then integrated using different weightings, according to their relevance. A lower weighting was assigned to the sediment chemistry data and to the sub-lethal effects, compared to that describing pollutant bioavailability and the ecotoxicological effects at the organism level (Fig. 6).

Figure 6. Functioning scheme for the integration of results derived from the 4 LOEs and using a WOE approach.

The integrated assessment occurs through a specific module that can normalise the hazard values of the individual modules.

In figure 7 an example of model output regarding the WOE integration of data from the multiple LOEs is showed.



Figure 7. Model output for the WOE integration of data from the multiple LOEs.

Suter, G.W. (1993). *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

### 3. DISCUSSION AND CONCLUSION

As a result of some applications tested on otherwise contaminated sediments coming from different kind of environments (industrial harbour, lagoon and coastal areas), the described model allows the possibility of investigating the complexity of sediment quality characterization through integration of data from multi-disciplinary approaches.

This evaluating model represents an additional way of the WOE approach that has been converted in synthetic indices, which are easy to apply for new users and easy to read for non-expert stakeholders, to provide an objective evaluation of sediment quality in different environmental contexts.

Among the main advantages, the model appears versatile, and the modules (LOEs) can be used singly or in an integrative approach with an increased sensitivity and ability to discriminate between different conditions. Maintaining the general structure, the model is easy to update or to adapt to local or national specificities, i.e. to include new parameters, normative limits or SQGs in LOE1, of additional species, biomarkers or ecotoxicological bioassays in LOE2, LOE3 and LOE4.

The integration of both the chemical and toxicological analyses provides a powerful tool for determination of the hazards associated with polluted sediments and the options for dredging activities. Additional LOEs, i.e. on population/community or human health levels, can be added as new and specific modules for future development, to support more comprehensive processes of environmental risk assessment and management decisions

### REFERENCES

Chapman, P.M. K.T. Ho, W.R.Jr Munns, K. Solomon, M.P. Weinstein, (2002). Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 44, pp. 271-278.

Chapman, P.M., (2007). Determining when contamination is pollution - weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ Int.*, vol. 33, no. 4, pp. 492-501.

Galloway, T.S., R.J. Brown, M.A. Browne, A. Dissanayake, D. Lowe, M.B. Jones, M.H. Depledge (2004). A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, pp. 1723-1731.

McCarty, L.S.; M. Power, K.R. Munkittrick, (2002). Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. *Human Ecol. Risk Assess.*, vol. 8, pp. 159-164.



# Proposta di una batteria minima di biosaggi per valutazioni di ecotossicità ambientale mediante analisi statistica multivariata

S. Balzamo<sup>a\*</sup>, G. Finocchiaro<sup>a</sup>, C. Frizza<sup>a</sup>, D.Conti<sup>a</sup>, C. Martone<sup>a</sup>, F.Cadoni<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ISPRA, Roma , Italia – stefania.balzamo@isprambiente.it

**Sommario** – La valutazione dell’impatto sull’ambiente del riutilizzo dei rifiuti o della contaminazione di siti da bonificare può essere condotta mediante batterie di biosaggi rapidi ed economici. Per ciascuna matrice da monitorare è importante usare batterie specifiche, sensibili ma anche utilizzare il numero minimo di biosaggi.

Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare una batteria minima di biosaggi ecotossicologici per un sito contaminato mediante l’applicazione di tecniche di statistica multivariata. I dati sono stati forniti da alcuni Laboratori delle ARPA/APPA ed elaborati da ISPRA. Una batteria minima costituita da tre biosaggi viene proposta per il suolo contaminato. Un aspetto da considerare è l’esigenza di armonizzazione a livello nazionale le informazioni minime necessarie che accompagnano i risultati ecotossicologici prodotti dalle ARPA.

**Keywords:** ecotossicità - batteria di saggi - suoli contaminati – HCA, PCA, NLM, Logistic Regression

## 1. INTRODUZIONE

I saggi ecotossicologici sono usati per la determinazione della presenza di inquinanti in composizione incognita in molte matrici ambientali quali acque di scarico, ma anche rifiuti e suoli contaminati. Generalmente l’approccio chimico è utilizzato per definire la conformità rispetto a valori limite definiti da normative, mentre l’uso dei saggi ecotossicologici permette di misurare direttamente la tossicità per l’uomo o per l’ambiente. Infatti i saggi biologici rispondono in modo integrato a tutti i composti presenti nel campione in esame riuscendo a quantificare anche effetti sinergici tra i diversi inquinanti o tra gli inquinanti e i componenti della matrice analizzata.

Come è noto, nessun singolo biosaggio risponde in modo appropriato a tutte le categorie di inquinanti, quindi per poter valutare l’impatto ambientale del riutilizzo dei rifiuti o per poter elaborare un’analisi di rischio ambientale in caso di siti contaminati è necessario utilizzare batterie di biosaggi *fit for purpose*.

In Italia il sistema delle Agenzie (ARPA/APPA) ha nella vigilanza e controllo ambientale il suo ruolo istituzionale. Anche nella caratterizzazione dei siti di bonifica, svolge una missione fondamentale convalidando, per il Ministero dell’Ambiente, la Tutela del Territorio e del Mare i risultati prodotti dai laboratori che eseguono il piano di caratterizzazione di siti inquinati.

Per armonizzare i protocolli e i metodi ecotossicologici utilizzati dalle ARPA/APPA per i loro controlli è stato organizzato un gruppo di lavoro sull’ecotossicologia (GdL) composto da ISPRA con ARPA

Campania, ARPA Emilia Romagna, ARPA Piemonte, ARPA Sardegna, ARPA Sicilia, ARPA Toscana, ARPA Umbria, ARPA Veneto.

Uno dei primi obiettivi che il GdL si è proposto di raggiungere è stato quello di costruire una banca dati che contenesse i risultati di tossicità ottenuti su diverse matrici ambientali quali: siti contaminati, rifiuti, fanghi, percolati di discarica. I documenti di raccolta dati sono stati condivisi tra le diverse ARPA e, oltre i risultati dei saggi ecotossicologici condotti sulle diverse matrici ambientali, sono state inserite anche tutte quelle informazioni necessarie ad inquadrare i risultati nel contesto da caratterizzare. Tutti questi dati dovevano costituire la prima versione di una banca dati ecotossicologica che raccogliesse tutti i dati di tossicità ambientale disponibili a livello nazionale per le diverse matrici ambientali. E’ stata osservata una forte disomogeneità tra i dati pervenuti dalle diverse ARPA sia in termini di numero di biosaggi eseguiti sulle diverse matrici, sia rispetto alle procedure utilizzate. Inoltre nei rapporti di prova vengono riportate differenti tipologie di informazioni e generalmente molto esigue tanto da non rendere utilizzabili tali risultati in contenuti diversi. E’ stata quindi evidenziata l’importanza di procedere ad un’armonizzazione nei risultati delle prove riportate e nelle informazioni minime da produrre nel rapporto finale.

Anche il Ministero dell’Ambiente francese che aveva richiesto la costituzione di una banca dati contenente tutte le informazioni presenti a livello nazionale sull’ecotossicità dei rifiuti, aveva già evidenziato problemi di omogeneità nella conduzione dei saggi ecotossicologici sui rifiuti. Questo è dovuto alla mancanza a livello europeo e/o nazionale di una strategia comune per la valutazione dell’ecotossicità dei rifiuti o di altre matrici ambientali. In tale ambito ricercatori francesi hanno condotto un interessante studio per la definizione della batteria minima utilizzata per valutare la tossicità ambientale dei rifiuti (P. Pandard et al., 2006 e B.M.Gauwlik, et al, 2006). Su un numero ristretto di dati presenti nella banca dati (circa 40) sono stati utilizzati metodi statistici (metodi multivariati lineari e non lineari) per ottimizzare una batteria di biosaggi senza perdita di informazioni in grado di definire l’ecotossicità di un rifiuto.

Uno studio analogo, ma sulla ecotossicità di suoli inquinati, è stato condotto da ISPRA con la cooperazione delle ARPA, che hanno partecipato al GdL già citato. Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare una batteria minima di saggi per la valutazione di ecotossicità di suoli contaminati mediante l’applicazione dell’analisi statistica multivariata.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Documento di raccolta dei risultati dei biosaggi

I dati originari, riguardanti i saggi ecotossicologici eseguiti dai laboratori ARPA/APPA del GdL, su discariche, suoli

\* Stefania Balzamo. ISPRA - Servizio di Metrologia Ambientale, Via di Castel Romano,100 – 00128 Roma, Italia – tel 0039 0650073228 - fax 0039 065050519

contaminati e fanghi conciarati, sono stati inviati al Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA sotto forma di documenti in formato elettronico. Da una loro valutazione preliminare è risultato che le modalità di registrazione delle informazioni ecotossicologiche (tipologia di matrice analizzata, localizzazione dei punti di prelievo dei campioni, numerazione dei campioni, riferimenti normativi dei metodi biologici, espressione dei risultati) sono estremamente diversificate tra le varie Agenzie.

Al fine di selezionare campioni di una stessa matrice analizzati contemporaneamente con differenti saggi ecotossicologici, si è quindi proceduto a:

1. armonizzare tutti i dati inviati dalle ARPA/APPA in un nuovo documento di raccolta elaborato da ISPRA;
2. suddividere i dati ecotossicologici ritenuti idonei allo studio in tre documenti separati, denominati I) Elutriato di suolo; II) Suolo; III) Percolato;
3. selezionare i dati da sottoporre ad analisi statistica multivariata.

Il gruppo di dati selezionati sono stati quelli forniti da ARPA Piemonte poiché sono risultati i soli costituiti da un numero sufficiente di campioni di suolo contaminato ( 29 ) analizzati contemporaneamente da 6 saggi ecotossicologici e 8 *end point*. Esso è stato organizzato in un documento definitivo, denominato “Suolo Contaminato batteria biosaggi” (SC<sub>bb</sub>).

## 2.2 Biosaggi

Nella tabella 1 sono presentati i biosaggi eseguiti sul campione di dati, successivamente analizzato con le tecniche di statistica multivariata.

Poiché i saggi effettuati dai laboratori ARPA/APPA non hanno previsto, per il calcolo dell'EC<sub>50</sub>, l'utilizzo di concentrazioni diverse di ogni singolo campione, ma solo

una risposta di tossicità, è stato necessario normalizzare i risultati ecotossicologici a disposizione, per porre a confronto i diversi metodi.

Inoltre, per stabilire un giudizio di tossicità finale su ogni singolo campione analizzato è stata ricavata una scala dicotomica di tossicità, incrociando e accorpando i livelli di tossicità dei diversi metodi ecotossicologici considerati (tabella 2)

**Tabella 2. Giudizio finale di tossicità**

Inibizione Ig% -Ir%- Ib%- Igr%	Mortalità M%	IG%	Giudizio di tossicità
51-100	51-100	0-50	Da molto tossico a tossico
0-50	0-50	51-100	Da debolmente tossico a nessun effetto

## 3. RISULTATI

Nonostante l'esiguità del gruppo di dati selezionato, si è proceduto all'applicazione delle analisi statistiche sui dati ecotossicologici. Si è iniziato con un'analisi descrittiva (Rojcková-Padrtořová, 1998) del dataset, SC<sub>bb</sub>, oggetto d'indagine, da cui è emerso che, rispetto al giudizio di tossicità finale (tabella 2), le percentuali maggiori di risultati “esatti” sul totale dei campioni si sono avute per i saggi di germinazione con Piante (*Lepidium* 85,3%) e di mortalità con Collemboli (93,1%), mentre la percentuale più bassa è da attribuire al saggio d'inibizione di crescita con Ostracodi. Si ritiene che un risultato possa essere considerato “esatto” quando il giudizio di tossicità finale coincide con il giudizio di tossicità del singolo test (fig.1).

**Tab 1 – Saggi ecotossicologici**

Organismo	Endpoint	Espressione del risultato	Tipo di tossicità	Metodo utilizzato
<u>Suolo fase solida</u> <i>Heterocypris incongruens</i> (Ostracodi)	Mortalità Inibizione di crescita	M% Ig%	Cronica (6 gg)	Ostracodotoxkit F method
<i>Folsomia candida</i> (Collemboli)	Mortalità Inibizione del tasso riproduttivo	M% Ir%	Cronica (28 gg)	ISO 11267: 1999
<i>Lepidium sativum</i> (Piante)	Inibizione della germinazione e dell'allungamento radicale	IG%	Acuta (3 gg)	UNICHIM 1651: 2003
<i>Cucumis sativus</i> (Piante)	Inibizione della germinazione e dell'allungamento radicale	IG%	Acuta (3 gg)	UNICHIM 1651: 2003
<u>Elutriato di suolo</u> <i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i> (Alghe)	Inibizione del tasso di crescita	Igr%	Acuta (3 gg)	UNI EN IS 8692: 2005
<i>Vibrio fischeri</i> (Batteri)	Inibizione della bioluminescenza	Ib %	Acuta (30 min.)	APAT-IRSA-CNR 8030 Man 29/2003

Note: IG: indice di germinazione (IRSA 1983)

Successivamente, i dati provenienti dai diversi saggi ecotossicologici effettuati, sono stati analizzati mediante l'uso combinato delle seguenti tipologie di analisi statistiche multivariate: "Analisi dei gruppi" (*Cluster Analysis*), "Analisi delle componenti principali" (*Principal Component Analysis*), "Non Linear Mapping" e "Regressione Logistica" (*Logistic Regression*).

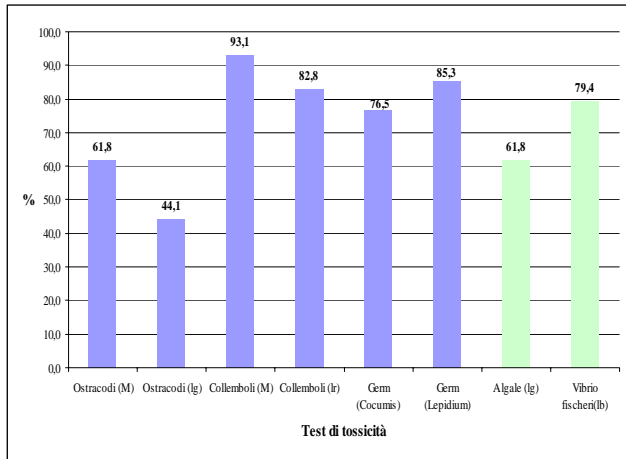


Figura 1 : Percentuale di risultati "esatti" sul totale dei campioni testati da ogni saggio di tossicità

Inizialmente la matrice di dati ecotossicologici 8 x 29 (*endpoint x samples*) è stata analizzata mediante la "Analisi gerarchica dei gruppi" (*Hierarchical Cluster Analysis - HCA*).

Lo scopo di questa analisi è quello di generare un insieme di partizioni ordinate gerarchicamente (dendrogramma), nelle quali ogni gruppo ad un qualunque livello fa parte di un gruppo più ampio ad un livello successivo. I gruppi sono formati da elementi omogenei, secondo un criterio stabilito a priori, a cui poi attribuire un certo numero di caratteristiche proprie di tutti i componenti del gruppo.

Tutte le tecniche di analisi dei gruppi si basano sul concetto di distanza tra due elementi. Nella nostra analisi è stata utilizzata la *Average linkage*, (viene calcolata la misura della distanza tra due gruppi come media della distanza di ogni membro del "gruppo" da ogni membro dell'altro) in quanto questa procedura è comunemente adoperata per tale varietà dei dati (J. Devillers et.al ,1988 e L. Fabbris , 1997). A causa della natura dei dati utilizzati, questa tipologia di analisi soffre di due lacune:

- la mancanza di continuità (ciò significa che un piccolo errore nella distanza potrebbe portare a una diversa struttura del dendrogramma)
- la mancanza di stabilità (ad esempio l'aggiunta o l'eliminazione di uno o due oggetti potrebbe causare una diversa struttura della gerarchia che si delinea).

E' stato quindi applicato un altro metodo statistico chiamato Analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis - PCA*). Il metodo è lineare cioè le nuove variabili generate sono una combinazione lineare di quelle originali. Per confermare i risultati ottenuti con la PCA si è applicata la *Non Linear Mapping (NLM)* utilizzando proprio le prime quattro componenti principali (96,7% della varianza) come *input* nel *NLM* (Software statistico R), con distanza

Euclidea, che hanno prodotto una mappa soddisfacente dopo 20 iterazioni con un valore di *stress* pari a 0,00428.

Brevemente, la *NLM* (J.W. Sammon, JR. (1969) ha come obiettivo quello di rappresentare un set di punti definiti in uno spazio n-dimensionale, da una configurazione di dati, umanamente percettibile, in un più basso spazio d-dimensionale (d= 2 o 3). La *NLM* prova a mantenere le distanze tra i punti nel nuovo spazio generato tanto più similmente possibile alle distanze tra i punti nello spazio originale. La procedura per effettuare questa trasformazione consiste nel calcolare una *mapping error* (E) tra le distanze nello spazio originale e le distanze nella *non linear map* ed è una procedura iterativa.

Infine è stata utilizzata anche la Regressione Logistica con metodo *step wise*, semplicemente per avere conferma di quali biosaggi mantenevano il modello statisticamente significativo.

La scelta di utilizzare più tecniche statistiche per lo stesso scopo è stata fatta al fine di confermare e integrare in fase di interpretazione i risultati più significativi che le varie tecniche hanno evidenziato.

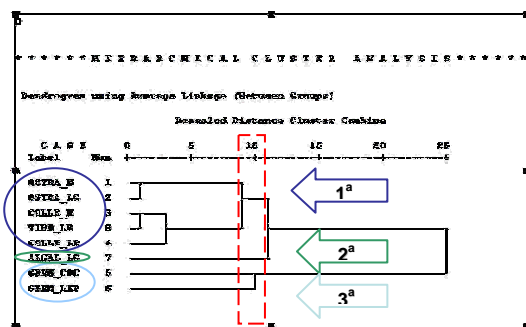
In dettaglio, la *HCA* (fig.2) ha mostrato che i biosaggi considerati sono raggruppabili in tre gruppi:

- 1) saggio di germinazione con *Lepidium sativum* e saggio di germinazione con *Cucumis sativus*;
- 2) saggio algale;
- 3) saggi di mortalità e di inibizione del tasso riproduttivo con Collemboli, saggio di inibizione della bioluminescenza dei batteri e saggi di mortalità e di inibizione di crescita con Ostracodi.

Per le figure 2, 3 e 4 vengono utilizzate le seguenti abbreviazioni:

OSTRA M: saggio di mortalità con Ostracodi; OSTRA IG: saggio di inibizione di crescita con Ostracodi; COLLE M: saggio di mortalità con Collemboli; VIBR IB: inibizione della bioluminescenza dei batteri; COLLE IG: saggio di inibizione del tasso riproduttivo con Collemboli; ALGAL IG: inibizione del tasso di crescita di alghe; GERM COC: saggio di inibizione della germinazione e allungamento radicale con *Cocumis sativus*; GERM LEP: saggio di inibizione della germinazione e allungamento radicale con *Lepidium sativum*.

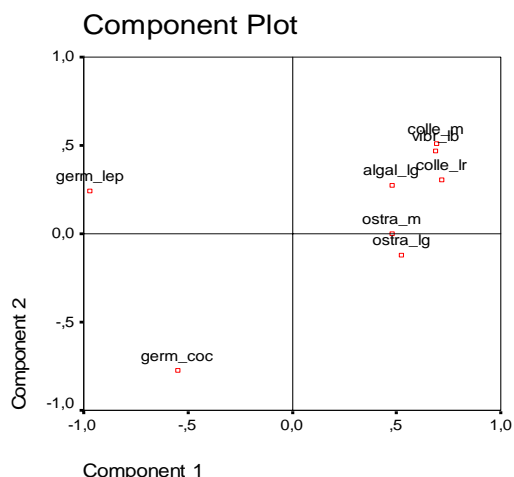
Dendrogramma



**Note:** I tre ovali riportati a sinistra rappresentano i tre gruppi (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> freccia) che si sono formati dopo la decima iterazione, segnalata dalla linea tratteggiata in rosso

Figura 2 Dendrogramma per gli 8 *endpoint* ecotossicologici analizzati

L'analisi delle componenti principali eseguita successivamente oltre a riconfermare che i due saggi di

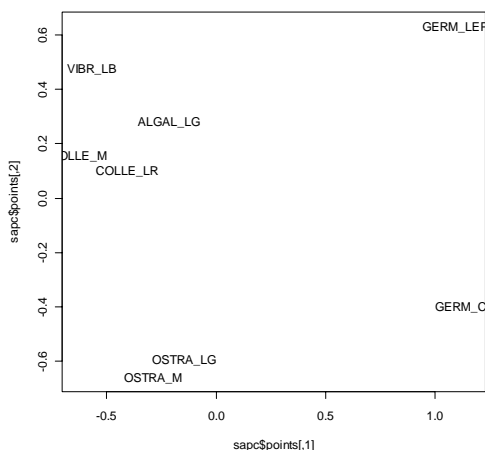


germinazione si comportano in maniera nettamente differente dagli altri saggi evidenzia anche una differenza

**Figura 3: Piano fattoriale 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> componente principale (PCA) - Risultati dell'elaborazione**

tra le due specie. Ciò fa ipotizzare quindi che i due saggi possono fornire informazione diverse dagli altri. In dettaglio, il saggio con *Lepidium sativum* si lega fortemente ed in maniera negativa alla prima componente principale che spiega da sola il 68,8% della varianza totale, mentre il saggio con *Cucumis sativus* è fortemente legato, sempre in maniera negativa, alla seconda componente principale che spiega da sola il 17,6% della varianza totale (figura 3).

La specificità dei saggi di germinazione rispetto agli altri è stata confermata anche dalla NLM (figura 4).



**Figura 4: Risultati dell'elaborazione con la Non Linear Mapping (NLM)**

Infine è stata utilizzata anche la Regressione Logistica con metodo *step wise* per la selezione del modello statisticamente significativo che è risultato essere quello con il saggio di germinazione con *Lepidium sativum* e con il saggio di mortalità con *Folsomia candida*.

Concludendo, la lettura integrata dei risultati ottenuti da ciascuna analisi ci porta a individuare una possibile batteria minima per la valutazione ecotossicologica di un suolo contaminato costituita dai seguenti saggi:

- il saggio algale con *P. subcapitata*

- il saggio di germinazione con *L. sativum*
- il saggio di mortalità con *F. candida*

#### 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il risultato seppur incoraggiante è da ritenersi ancora preliminare soprattutto perché ottenuto su un campione di dati esiguo. Al fine di rendere statisticamente più corretti i risultati si sta progettando una seconda raccolta di dati ecotossicologici in grado di garantire una numerosità di campioni e possibilmente di biosaggi sufficientemente più ampia.

Al fine di ottenere, anche in futuro, una omogeneità di dati ecotossicologici per poter continuare a popolare la banca dati predisposta per lo studio condotto, sono state decise alcune semplici regole che verranno definite all'interno del GdL e condivise tra tutte le ARPA/APPA riportandole all'interno di Linee guida prodotte da ISPRA.

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia ARPA Piemonte che ha fornito i dati per l'applicazione dell'elaborazione statistica del presente lavoro.

#### BIBLIOGRAFIA

##### Bibliografia da rivista scientifica

- J. Devillers et.al (1988) "Comparison of ecotoxicological data by means of a fan approach combining cluster and correspondence factor analyses.
- L. Fabbris (1997) "Statistica multivariata - Analisi esplorativa dei dati". The McGraw-Hill Companies, S.r.l
- B.M.Gauwlik, and H. Moser (2006). "Problems around Soil and Waste III- The H-14 Criterion and (Bio)analytical Approaches for ecotoxicological Waste Characterization". Workshop Proceedings.
- P. Pandard et al. (2006) "Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes." Science of the Total Environment vol.363, pp.114 -125
- R.Rojcková-Padrtoová (1998) "Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery". Chemosphere, Vol.37, No.3, pp.495-507
- J.W. Sammon, JR. (1969) "A Non linear Mapping for data structure analysis". IEEE Transactions on Computers, VOL. C-18, NO.5, May 1969

##### Bibliografia da sito web

Software statistico R: <http://www.r-project.org>

# Monitoraggio del Rio Gambero in Alto Adige mediante test ecotossicologici multispecie

F. Lazzeri<sup>a,\*</sup>, M. Casera<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio Biologico Provinciale, APPA Bolzano, Italia – francesca.lazzeri@provincia.bz.it

<sup>b</sup> Laboratorio Biologico Provinciale, APPA Bolzano, Italia – maddalena.casera@provincia.bz.it

**Abstract** - Alla fine del 2006 e nell'estate 2008 tra le misure a lungo termine previste dal "Progetto di tutela del gambero di acqua dolce *Austropotamobius pallipes italicus*" (2002-2006), sono state inserite analisi ecotossicologiche multispecie su alcuni campioni di sedimento e acqua superficiale prelevati dal Rio Gambero. Il Rio Gambero si trova nel comune di Lana vicino a Merano (Bz) nelle immediate vicinanze di un campo da golf ed è inoltre circondato da terreno agricolo coltivato intensivamente. Negli ultimi anni, in questo corso d'acqua, si è assistito ad una drastica riduzione della popolazione di questi crostacei. Al fine di comprenderne le cause, sono stati condotti test ecotossicologici multispecie, sia sull'acqua superficiale che sui sedimenti.

**Parole chiave:** ecotossicologia, sedimenti, batteria di test, Rio Gambero

## 1. INTRODUZIONE

Il gambero di fiume (*Austropotamobius pallipes italicus*) (Figura 1), l'unica specie indigena di gambero in Alto Adige, è una delle specie animali minacciate di estinzione nel territorio della provincia di Bolzano. Le numerose popolazioni di gambero una volta presenti sono state decimate da svariati fattori tra i quali la "peste dei gamberi", una malattia introdotta verso la fine del XIX secolo, l'inquinamento delle acque e le opere di regolazione e sistemazione delle acque superficiali.



Figura 1. *Austropotamobius pallipes italicus*

Negli anni 2000-2001 il Laboratorio Biologico incaricò il Dott. Leopold Füreder dell'Università di Innsbruck (Austria) di eseguire una ricerca sulla distribuzione del gambero di fiume in provincia di Bolzano. Gli allarmanti risultati di questo studio portarono alla costituzione del "Gruppo di Lavoro Gambero", costituito da vari uffici e

istituzioni coinvolti nella problematica. Il primo passo fu l'attuazione del "Progetto di tutela del gambero di fiume (2002-2006)", che comprendeva l'elaborazione e la parziale messa in opera di proposte concrete per il miglioramento della situazione e per una durevole tutela del gambero. Le misure a breve termine sono state attivate, mentre quelle a lungo termine sono in fase di realizzazione. Alla fine del 2006, tra le misure a lungo termine previste dal progetto, sono state inserite le analisi ecotossicologiche multispecie su alcuni campioni di sedimento e acqua superficiale prelevati dal **Rio Gambero**.

Il Rio Gambero si trova nel comune di Lana vicino a Merano (Bz) nelle immediate vicinanze di un campo da golf ed è inoltre circondato da terreno agricolo coltivato intensivamente. Negli ultimi anni, in questo corso d'acqua, un tempo ricco di gamberi di fiume, si è assistito ad una drastica riduzione della popolazione di questi crostacei.

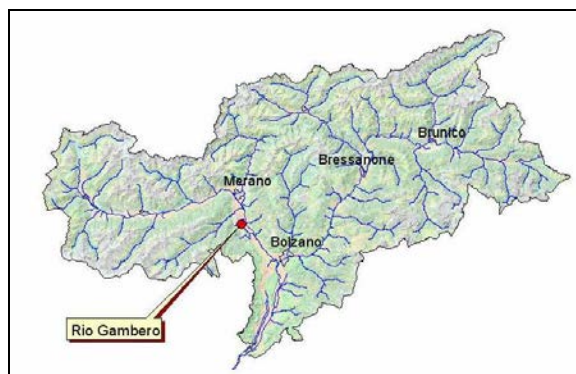


Figura 2. Rio Gambero presso Lana (Bz)

Al fine di comprenderne le cause e soprattutto di verificare un possibile impatto dovuto ai trattamenti del manto erboso del campo da golf, sono stati condotti test ecotossicologici multispecie, sia sull'acqua superficiale che sui sedimenti. Il sedimento è infatti il comparto in cui convergono i processi di concentrazione degli inquinanti organici ed inorganici. Per una corretta stima dei livelli di tossicità, i saggi biologici sono stati applicati mediante una batteria di test costituita da categorie trofiche, livelli evolutivi, stadi vitali, vie di esposizione ed habitat differenti. Pertanto per la valutazione della tossicità è stata utilizzata una batteria di test costituita dal test con i batteri bioluminescenti (*Vibrio fischeri*), il test di fitotossicità a 72 h (germinazione e allungamento radicale combinati in Indice di Germinabilità) con semi di *Lepidium sativum* (crescione), di *Cucumis sativus* (cetriolo) e del *Sorghum saccharatum* (sorgo) e il test acuto con il cladocero *Daphnia magna*.

\* Francesca Lazzeri. Laboratorio Biologico Provinciale (APPA Bz) Laives (Bz), Tel +39 0471 950431, Fax 0471 951263

I primi due test sono stati effettuati sui campioni di acqua, sedimento e sull'elutriato, mentre il test di fitotossicità nel 2006 è stato condotto sia sul sedimento tal quale che sull'elutriato, mentre nel 2008 solamente sul sedimento tal quale.

## 2. PUNTI DI CAMPIONAMENTO

Il prelievo di acqua e sedimento è stato eseguito nel 2006 e nel 2008 in tre punti del rio Gambero (Figure 3, 4 e 5): 1) alla sorgente del torrente Gambero, 2) all'uscita del laghetto di fitodepurazione, realizzato nella parte finale del campo da golf per ridurre i possibili impatti dei trattamenti per il mantenimento del manto erboso, il cui effluente recapita direttamente nel rio Gambero e 3) alcune decine di metri sotto la loro confluenza.



Fig.3. Punto 1      Fig.4. Punto 2      Fig.5. Punto 3

## 3. MATERIALI E METODI

Per valutare la tossicità dei campioni in esame sono stati utilizzati il **test di tossicità acuta a 24 h con il cladocero *Daphnia magna*** (metodica UNI EN ISO 6341, 1999), il **test di tossicità acuta con i batteri bioluminescenti** della specie *Vibrio fischeri* (protocollo "Comparison test" e "Basic Solid Phase Test" per strumento Microtox, metodica ISO 11348-3, 1998) e il **test di fitotossicità a 72 h** (germinazione e allungamento radicale combinati in Indice di Germinabilità) con semi di *Lepidium sativum* (crescione), di *Cucumis sativus* (cetriolo) e del *Sorghum saccharatum* (sorgo), seguendo la metodica UNICHIM 1651 (2003). I primi due test sono stati effettuati sui campioni di acqua, sedimento e sull'elutriato, mentre il test di fitotossicità è stato condotto solamente sul sedimento tal quale e sull'elutriato. L'elutriato è stato ottenuto seguendo il metodo proposto da Burton et al. (1996), che prevede un rapporto tra sedimento e fase acquosa pari a 1:4, tale miscela è stata agitata per 30 minuti e lasciata quindi sedimentare per 1 ora. Il surnatante è stato prelevato e centrifugato per 15 minuti a 10000 x g per ridurre al minimo le particelle solide sospese. Il campione così centrifugato è stato usato per i test. La fase acquosa utilizzata è rappresentata per il test con *Daphnia magna* dall'acqua di diluizione preparata come previsto dalla metodica UNI EN ISO 6341, 1999, mentre per il test con i batteri bioluminescenti e di fitotossicità da acqua ultrapura.

### 3.1 Espressione dei risultati

Nel test con *Daphnia magna* i risultati sono espressi come % di effetto, ovvero come il numero di organismi immobili e/o morti dopo il tempo di esposizione di 24 ore, rispetto al controllo. Anche la riduzione della bioluminescenza di *Vibrio fischeri* a 15' viene espressa come % d'effetto rispetto al controllo. Per i batteri bioluminescenti il trattamento statistico dei dati è effettuato direttamente dal software che gestisce lo strumento (Microtox Omni Windows Software). In base a quanto definito dalle metodiche di riferimento (ISO, 1998) i valori che si

discostano dal controllo più del 20% sono considerati differenti da questo ultimo, ovvero si considerano tossici i campioni per i quali viene registrata una percentuale di inibizione  $\geq 20\%$ .

Per il test di fitotossicità, al termine dell'esposizione sono stati registrati il numero dei semi germinati e la lunghezza radicale; i due valori sono stati combinati in Indice di Germinazione (IG%). I dati di germinabilità media e di lunghezza media della radice di ciascun seme sono stati saggiati mediante l'analisi della varianza (ANOVA univariata).

## 4. RISULTATI

Sia nel 2006 che nel 2008, il test di tossicità condotto con *Daphnia magna* sia **sull'acqua superficiale** che sull'**elutriato** (Tabelle 1 e 2), non ha evidenziato alcuna tossicità, per nessuno dei tre campioni in esame. Anche l'analisi dell'acqua superficiale con i batteri bioluminescenti della specie *Vibrio fischeri* non ha rilevato tossicità per nessuno dei tre campioni in esame (Tabella 1).

Tabella 1. ACQUA SUPERFICIALE

Punti di campionamento	<i>Daphnia magna</i> 24 h (% immobilizzazione)		<i>Vibrio fischeri</i> 15' (% di effetto)	
	2006	2008	2006	2008
Rio Gambero 1 sorgente	0	3,3	1,6	-8,2 ormesi
Rio Gambero 2 fitodepurazione	0	0	0,3	4,4
Rio Gambero 3 valle confluenza	0	0	3,4	-6,9 ormesi

Per quanto riguarda l'analisi degli **elutriati** con *Vibrio fischeri* (Tabella 2), sia nell'anno 2006 che 2008, il campione **Rio Gambero 1** ha evidenziato una leggera tossicità, mentre il campione **Rio Gambero 2** ha presentato una lievissima ormesi. Per il campione **Rio Gambero 3** nel 2008 si è registrato invece un aumento della tossicità rispetto al 2006, con un'inibizione della bioluminescenza superiore al limite convenzionale del 20% (in rosso in Tabella 2).

Tabella 2. ELUTRIATO

Punti di campionamento	<i>Daphnia magna</i> 24 h (% immobilizzazione)		<i>Vibrio fischeri</i> 15' (% di effetto)	
	2006	2008	2006	2008
Rio Gambero 1 sorgente	0	0	17,5	16,09
Rio Gambero 2 fitodepurazione	0	0	-0,7 ormesi	-3,435 ormesi
Rio Gambero 3 valle confluenza	0	0	12,0	33,04

■ = inibizione > 20%

L'analisi del **sedimento tal quale** con i batteri bioluminescenti (Basic Solid Phase Test), ha rilevato sia nel 2006 che nel 2008 un maggiore effetto inibitorio per il campione **Rio Gambero 2** (Tabella 3).

Tabella 3. SEDIMENTO TAL QUALE

Punti di campionamento	<i>Vibrio fischeri</i> EC50 a 30' (mg/L)	
	2006	2008
Rio Gambero 1 sorgente	2751	40890
Rio Gambero 2 fitodepurazione	447,6	583,6
Rio Gambero 3 valle confluenza	1960	4377

Per la classificazione dei risultati del "Solid Phase Test" è stata utilizzata la suddivisione riportata in tabella 4, fornita dalla Azur Environment che commercializza il test Microtox. Le classi di qualità sono state numerate con fattori decrescenti da 5 (pessima qualità) a 1 (ottima qualità) sulla base di quanto già previsto per i metodi biologici che utilizzano i macroinvertebrati.

Tabella 4. CLASSIFICAZIONE DEI SEDIMENTI SECONDO IL SOLID PHASE TEST

Solid phase test		
Classi di qualità	Risultati (EC in %)	Risultati (EC in g/l)
5	< 0,01%	< 0,1
4	Da 0,01 a 0,1%	0,1-1
3	Da 0,1 a 1%	1-10
2	Da 1 a 10%	10-100
1	> 10%	> 100

Ciò premesso, sia per il 2006 che per il 2008, i sedimenti del campione **Rio Gambero 2** si possono collocare in una quarta classe di qualità, i sedimenti del punto **Rio Gambero 1** passano da una terza ad una seconda classe dal 2006 al 2008, mentre i sedimenti del sito **Rio Gambero 3** in entrambe le campagne si collocano in una terza classe di qualità.

Il **test di fitotossicità** con semi di *Lepidium sativum* (crescione), di *Cucumis sativus* (cetriolo) e del *Sorghum saccharatum* (sorgo) è stato condotto per 72 h al buio ed a 25 °C. Al termine dell'esposizione sono stati registrati il numero dei semi germinati e la lunghezza radicale; i due valori sono stati combinati in Indice di Germinazione (IG%).

$$\%IG = \frac{G_1 L_1}{G_c L_c} \cdot 100$$

dove  $G_1$  = numero di semi germinati nel campione  
 $G_c$  = numero di semi germinati nel controllo  
 $L_1$  = lunghezza radicale in mm nel campione  
 $L_c$  = lunghezza radicale in mm nel controllo

I risultati sono riportati nelle tabelle 5 e 6.

Tabella 5. RISULTATI TEST DI FITOTOSSICITÀ 2006

2006			
Punti di campionamento	<i>Cucumis sativus</i> 72 h (IG%)	<i>Lepidium sativus</i> 72 h (IG%)	<i>Sorghum saccharatum</i> 72 h (IG%)
Controllo	100,0	100,0	100,0
Rio Gambero 1 elutriato	132,8	147,6	124,2
Rio Gambero 1 sedimento	73,5	174,3	72,6
Rio Gambero 2 elutriato	109,6	121,3	136,2
Rio Gambero 2 sedimento	118,2	171,7	61,1
Rio Gambero 3 elutriato	118,7	100,6	111,7
Rio Gambero 3 sedimento	96,9	161,3	57,3

■ = inibizione > 20%

Tabella 6. RISULTATI TEST DI FITOTOSSICITÀ 2008

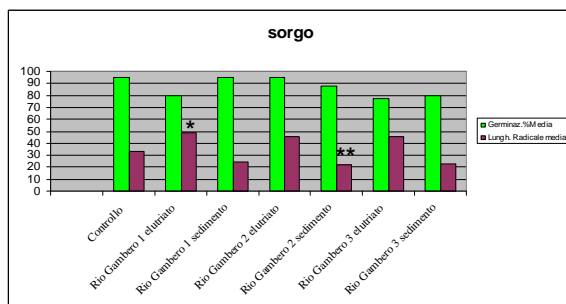
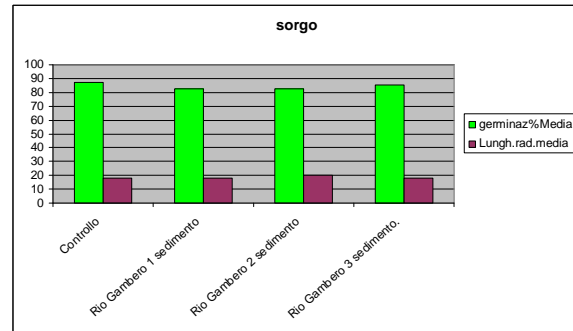
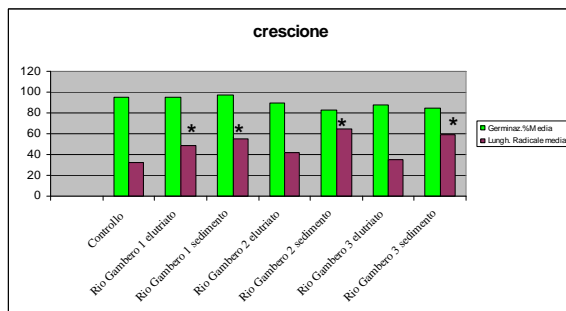
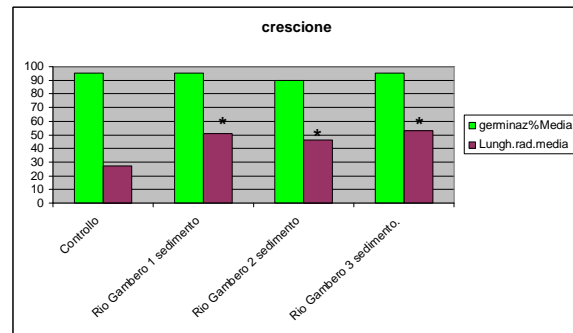
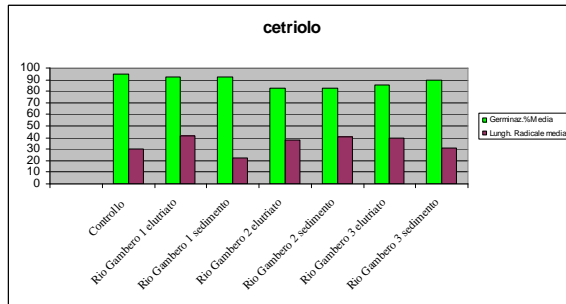
2008			
Punti di campionamento	<i>Cucumis sativus</i> 72 h (IG%)	<i>Lepidium sativus</i> 72 h (IG%)	<i>Sorghum saccharatum</i> 72 h (IG%)
Controllo	100,0	100,0	100,0
Rio Gambero 1 elutriato	n.r.	n.r.	n.r.
Rio Gambero 1 sedimento	66,8	189,1	94,0
Rio Gambero 2 elutriato	n.r.	n.r.	n.r.
Rio Gambero 2 sedimento	50,7	160,7	108,7
Rio Gambero 3 elutriato	n.r.	n.r.	n.r.
Rio Gambero 3 sedimento	71,4	198,8	98,2

n.r. = non rilevato

■ = inibizione > 20%

I dati di germinabilità media e di lunghezza media della radice di ciascun seme sono stati saggati mediante l'analisi della varianza (ANOVA univariata). I risultati sono riportati nei seguenti grafici.

Grafici 1.2.3 RISULTATI IN FORMA GRAFICA TEST DI FITOTOSSICITÀ 2006



\*differenza significativa rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ) –

**ormesi**

\*\* differenza significativa rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ) –

**tossicità**

Nel 2006 per quanto riguarda sia il cetriolo, che il sorgo, non si evidenziano differenze significative ( $p > 0,05$ ) tra la germinazione media del controllo e dei campioni, così come per l'allungamento radicale del cetriolo.

L'allungamento radicale medio del crescione risulta essere invece significativamente ( $p < 0.05$ ) maggiore rispetto al controllo per i campioni **Rio Gambero 1 elutriato** e **sedimento**, **Rio Gambero 2 sedimento** e **Rio gambero 3 sedimento** (fenomeno dell'ormesi).

Nel caso del sorgo si rileva invece un allungamento radicale significativamente ( $p < 0.05$ ) maggiore rispetto al controllo per il campione **Rio Gambero 1 elutriato** (ormesi), mentre per il campione **Rio Gambero 2 sedimento**, l'allungamento radicale è significativamente inferiore rispetto al controllo (tossicità).

Nel 2008 l'allungamento radicale medio del cetriolo risulta essere significativamente ( $p < 0.05$ ) minore rispetto al controllo per i campioni di **sedimento Rio Gambero 1** e **Rio Gambero 2**, rilevando quindi la presenza di tossicità. Per il crescione si rileva invece un allungamento radicale significativamente ( $p < 0.05$ ) maggiore rispetto al controllo per tutti i sedimenti saggiati (ormesi).

Anche nel 2008 nessuna differenza significativa è stata registrata tra la germinazione media delle tre specie di semi del controllo e quella dei campioni.

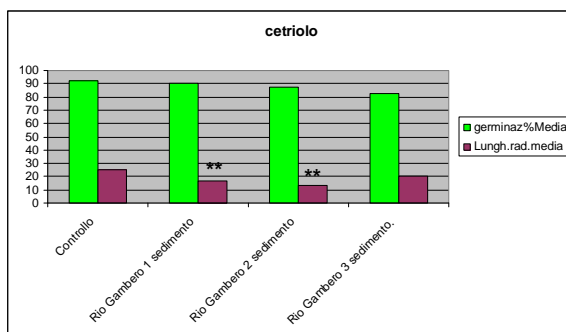
\*differenza significativa rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ) –

**ormesi**

\*\* differenza significativa rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ) –

**tossicità**

Grafici 4.5.6. RISULTATI IN FORMA GRAFICA TEST DI FITOTOSSICITÀ 2008



## 5. CONCLUSIONI

Nel 2006 sia mediante il test dei batteri bioluminescenti che mediante il test di fitotossicità con il sorgo, che risulta essere il più sensibile dei tre semi, il campione **Rio Gambero 2 sedimento tal quale**, situato presso il laghetto di fitodepurazione che fuoriesce dal campo da golf, ha rilevato tossicità. Anche nel 2008 il campione **Rio Gambero 2 sedimento tal quale** ha rilevato tossicità sia mediante il test



dei batteri bioluminescenti che mediante il test di fitotossicità con il cetriolo. Tossicità è stata inoltre rilevata con *Vibrio fischeri* anche per l'elutriato e il sedimento tal quale del campione **Rio Gambero 3**.

In entrambe le campagne di indagine (2006 e 2008), sia mediante il test dei batteri bioluminescenti che mediante il test di fitotossicità, il campione di sedimento **Rio Gambero 2**, situato presso il laghetto di fitodepurazione al margine del campo da golf, ha evidenziato tossicità, consolidando così l'ipotesi del possibile impatto negativo dei trattamenti del manto erboso sul corso d'acqua. Da qui la decisione di deviare l'effluente proveniente dal campo da golf verso una fossa distante dal rio Gambero (realizzazione nel 2009).

In conclusione i risultati dei test di tossicità hanno mostrato la diversa sensibilità degli organismi utilizzati e questo conferma la necessità di un approccio multispecie. In questo contesto infatti i saggi con i singoli organismi acquisiscono il loro massimo significato, consentendo di controllare possibili effetti negativi delle sostanze tossiche ai diversi livelli della rete trofica e di verificare l'eventuale presenza di tossici specifici per le singole specie in esame (Bari *et al.*, 1995).

Interessante è inoltre osservare i risultati ottenuti per le diverse matrici indagate: acqua superficiale, elutriato e sedimento tal quale. Dall'analisi dei risultati viene confermato quanto già noto per le acque superficiali, che solo in casi particolari e principalmente se vi sono scarichi tossici in atto, provocano tossicità acuta. Per quanto riguarda invece gli elutriati, essi permettono la valutazione della tossicità delle sostanze solubili in acqua e forniscono una stima realistica dei tossici realmente biodisponibili contenuti nei sedimenti (Harkey *et al.*, 1994). È pur vero però che molti inquinanti apolari come i PCB e gli IPA vengono scarsamente recuperati negli elutriati acquosi (Harkey *et al.*, 1994 e Ho and Quinn, 1993), escludendo così inquinanti che per le loro caratteristiche chimico-fisiche possono essere presenti in quantità rilevanti nel sedimento. Tali considerazioni, dimostrano che i test degli elutriati acquosi da soli non permettono una valutazione complessiva della qualità del sedimento (Ankley, 1990). Si può comunque affermare che il test degli elutriati può fornire utili valutazioni per gli organismi pelagici che vivono nella colonna d'acqua sovrastante il sedimento (Burton *et al.*, 1989). Con il "Solid Phase Test" e con il test di fitotossicità sul sedimento tal quale è invece possibile valutare l'effetto tossico dei sedimenti in toto dovuto alla presenza di sostanze sia polari che apolari e di composti organici ed inorganici. Inoltre vengono saggiate sia le sostanze biodisponibili che possono essere presenti nell'acqua interstiziale, sia quelle più strettamente associate al sedimento.

Il presente studio dimostra quindi come l'impiego di test ecotossicologici multispecie su matrici diverse (acqua e sedimento) sia utile per la valutazione della qualità degli ambienti acquatici e come i sedimenti siano uno dei comparti più efficaci per il monitoraggio ambientale.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Ankley, G.T. (1990). "Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fraction: pore water vs. elutriate". *Environ. Toxicol. And Chem.*, 10, pp. 1359-1366.

Bari, A., Minciardi, M.R., Rossi, G.L., Bonotto, F., Troiani, F. (1995). "Indagini su una risaia campione: analisi ambientali e chimico-tossicologiche". RT/AMB/95 ENEA

Burton, G.A., Jr, Ingersoll, C.G., Burnett L.C., Henry, M., Hinman M.L., Klaine S.J., Landrum P.F., Ross P. and Tuchman M. (1996). "A Comparison of Sediment Toxicity Test methods at Three Great Lake Areas of Concern". *J.Great Lakes Res.*, 22(3), pp. 495-511.

Burton, G.A., Jr, Stemmer, B.L., Wincks, K.L., Ross, P.E. and Burnett, L.C. (1989). "A multitrophic level evaluation of sediment toxicity in Waukegan and Indiana Harbors". *Environ. Toxicol. And Chem.*, 9, pp. 1193-1214.

Harkey, G.A., Landrum, P.F. and Klein, S.J. (1994). "Comparison of whole sediment, elutriate and pore water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays". *Environ. Toxicol. And Chem.*, 13, pp. 1315-1329.

Ho, K.T.Y. and Quinn, J.G. (1993). "Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox". *Environ. Toxicol. And Chem.*, 12, pp. 615-626.

ISO 11348-3 (1998). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria: 13 pp.

Metodo UNICHIM 1651 (2003). 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). UNICHIM: 22 pp.

Progetto Gambero di acqua dolce (2002-2006). Provincia Autonoma dell'Alto Adige. Ripartizione Agenzia Provinciale per l'Ambiente. <http://www.provincia.bz.it/agenzia-ambiente/progetti/progetto-gambero.asp>.

UNI EN ISO 6341 (1999). Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea). Prova di tossicità acuta: 14 pp.

# A multi-endpoints bioassay with *Amphibalanus amphitrite* larvae as a tool in ecotoxicology studies

V. Piazza \*, F. Garaventa , C. Corrà , M. Faimali

<sup>a</sup> Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISMAR-CNR), Genova, Italy

**Abstract** – In recent years massive efforts have been directed to identify ecologically relevant invertebrate toxicity testing models. The crustacean *Amphibalanus amphitrite* represent a valid model for ecotoxicology studies, as it is widely distributed, ecologically relevant and its larvae can be easily obtained and reared in laboratory. The UNICHIM standardization process of the acute toxicity assay with larvae (II stage nauplii) of *A. amphitrite* has recently been concluded. Aim of this work is to show the possibility of obtaining three distinct end-points (acute and sub-lethal), characterized by different sensitivity levels, by the use of the same model organism and the preparation of just one bioassay. Marine sediments (elutriates and whole sediment) were used as an example of environmental sample.

**Keywords:** ecotoxicology; *A. amphitrite*; bioassay; sub-lethal end-point.

## 1. INTRODUCTION

One of the most important steps in promoting marine ecotoxicological studies is to find some appropriate model organisms which can help elucidate both acute and chronic toxicities of marine pollutants with reproducible results, and understand the mechanism of toxic action at various levels of biological organizations (i.e. molecular, cellular, whole organisms and population). In this way, the ecotoxicological approach will also be of great importance for chemical regulation in marine environments (Moore et al., 2004).

For practical reasons, this model species should be abundant, widely distributed, ecologically relevant and experimentally manageable in the laboratory.

In a risk assessment of a chemical, test organisms are represented by algae (primary producers), invertebrates (primary consumers) and fish (secondary consumers). Validity of ecotoxicological studies based on biological assays, and accurate interpretation of results, require a good knowledge of the biology of the species used in the bioassay and its optimum handling in laboratory conditions. The protocol of the test shall be defined precisely and must be easily standardisable, in particular when dealing with the highly sensitive early stages of marine invertebrates.

Aquatic ecotoxicology studies the impact of chemical substances and pollutants on aquatic organisms under experimental conditions (Moiseenko, 2008). Most of toxicological studies are carried out at the level of individual organism as, at this level, toxicity can be revealed most clearly.

Laboratory biological tests (bioassays) have steadily increased in development and application over the last 10 years in the field of aquatic ecotoxicology. The constant

search for simplicity and cost efficiency of testing are reasons explaining the expanding use of bioassays.

Bioassays can be employed for ranking and screening chemicals, for novel applications enabling rapid detection of toxic effects in complex environmental samples, and for increasing the cost efficiency and diagnostic potential of hazard assessment schemes.

Recently, under UNICHIM supervision, standardization process for the acute toxicity assay of *Amphibalanus amphitrite* larvae (nauplii) has been concluded, and this test will be soon become an official protocol included within Italian legislation. The end-point proposed in the protocol is represented by immobilization; the number of immobile organisms is composed by the amount of dead larvae (mortality) and “not-swimming” larvae (larvae that present appendages movement without shifting their own barycentre).

Therefore, within the same bioassay, we could obtain two different end-points: mortality, that represents a lethal toxicity end-point, and immobilization, that can be considered sub-lethal, as it takes into account the presence of live but “not-swimming” larvae .

Moreover, a new behavioural toxicity bioassay with nauplii of *A. amphitrite*, called Swimming Speed Alteration test (SSA test), has been recently developed (Faimali et al., 2006). This bioassay is performed using the Swimming Behavioural Recorder system (SBR), a videocamera-based system, coupled with image analysis software, specifically designed to track and analyse linear swimming speed of aquatic invertebrates as sub-lethal end-point.

The aim of this work is to put in evidence the possibility of obtaining three different responses, with increasing sensitivity levels, within the same bioassay with *A. amphitrite* nauplii: an acute (mortality) and two sub-lethal (immobilization and swimming speed alteration) end-points. As an example, the toxicity of sediments (elutriates and whole sediment) collected in Venice lagoon has been analysed using this sensitive multilevel approach.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### Collection and preparation of test sediments

Sediments were collected in three sampling stations allocated within Venice lagoon in July 2009 and March 2010 some days prior to the experiment and were kept refrigerated (4°C) until their use for bioassays.

Two different sediment matrix were prepared:

#### *Elutriates*

Elutriates were prepared following EPA methodology (EPA 2001). An aliquot of sediment was collected and mixed in a flask with Filtered (0.22 µm) Natural Sea Water (FNSW) in a 1:4 ratio. Flasks were mixed with a magnetic stirrer for 1

\* Corresponding author. Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISMAR-CNR), via De Marini 6, 16149 Genova, Italy. Tel: +39 0106475409, Fax: +39 0106475400, E mail: veronica.piazza@ge.ismar.cnr.it

hour, then the mixture sediment/water was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, the supernatant collected and filtered with a sterile 0.22 µm filter. Obtained elutriate was used undiluted in bioassays (100%).

#### Whole sediment

Whole sediments were prepared following EPA methodology (EPA 1996): 87.5 ml of sediment were put in a 500 ml glass beaker and 387.5 ml of Filtered (0.22 µm) Natural Sea Water (FNSW) were added.

#### Model organism

*Amphibalanus amphitrite*, Darwin 1854 is a crustacean with an adult sessile stage and a series of planktonic larval phases. This organism was chosen as the model, not only because it is present all over the world, simple to rear, easily available and because barnacles play an important role in coastal ecosystem, but also because larvae exhibit a continuous swimming pattern. Embryos, kept in the mantle cavity of adult organism, are released as II stage nauplii. Development goes through four naupliar planktotrophic stages (instars III– VI) and a final lecithotrophic stage called cyprids. This last stage, after a period of substratum exploration, produces a series of reversible connections (attachment phase) and then, after an irreversible fixation to the substratum (settlement phase), undergoes metamorphosis into the juvenile.

Larvae for the bioassay were obtained from laboratory cultures of brood stock of *A. amphitrite*. Twenty to thirty adult barnacles were reared in 700 ml beakers containing aerated Filtered (0.45 µm) Natural Sea Water (FNSW) at 20±1°C, with a 16:8 h light : dark cycle. They were fed every other day with 50–100 ml of *Artemia salina* at a density of 20 larvae/ml, and 200–400 ml of *Tetraselmis suecica* at a concentration of 2·10<sup>6</sup> cells/ml. The seawater was changed three times a week, and barnacles were periodically rinsed with clean water to remove epibionts or debris. Twenty beakers of adults reared under such conditions produced nauplii every week for the assays throughout the year. Nauplii were collected and maintained in 500 ml gently aerated beakers with 0.22 µm FNSW until their use for bioassay.

#### Multi-endpoints bioassay

The toxicity of sediments was tested using the multi-endpoints approach with II stage nauplii of *A. amphitrite* on elutriates and whole sediment.

#### Elutriates exposition

Nauplii were collected from adult brood-stock 2–4 h before starting the toxicity assay. Toxicity tests were carried out by adding 15–20 nauplii into 25-well plates, each well containing 1 ml of test solution and filtered seawater as control. The test was performed in three replicates for each sediment sample.

All plates were kept dark at 20°C. After 24 and 48 h, plates were observed under the stereomicroscope, and larvae that were completely motionless for 10 seconds were counted as dead organisms, and the mortality percentage was calculated as compared to the control. Larvae that presented appendages movement without shifting their own barycentre were counted as “not-swimming”. The amount of dead and “not-swimming” larvae constitute “immobile” larvae, and the percentage of immobilization was calculated too. The swimming speed alteration (SSA) was measured in each well using the experimental set up described in Faimali et al. (2006). Data were finally referred as swimming

inhibition, normalized to the average swimming speed of the control ( $V =$  average swimming speed):

$$\text{Inhibition}(\%) = [(V_{\text{TREATED}} - V_{\text{CONTROL}}) / V_{\text{TREATED}}] * 100$$

#### Whole sediment exposure

The sediment/water mixture (prepared as described above) was placed at 20°C on a magnetic stirrer for 24 hours. Subsequently, II stage nauplii of *A. amphitrite*, collected 2–4 hours before starting the assay, were added into modified Falcon test-tubes, supplied with a 80µm mesh, in order to allow water exchange into the vessel and to avoid naupliar dispersion into the beaker; each beaker contained 2 Falcon tubes. After 24 and 48 h of exposure, larvae were collected from Falcon tubes and 15–20 were placed in 25-well plates, each well containing 1 ml of clean Filtered (0.22 µm) Natural Sea Water (FNSW). Their mortality, immobilization and swimming speed alteration were recorded as described in previous paragraph.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

In order to obtain an immediate analysis of data, results of sediments (A, B,C) toxicity were summarized in graphs that report results obtained by exposing organisms to not-diluted elutriate (Fig. 1) and to whole sediment (Fig. 2).

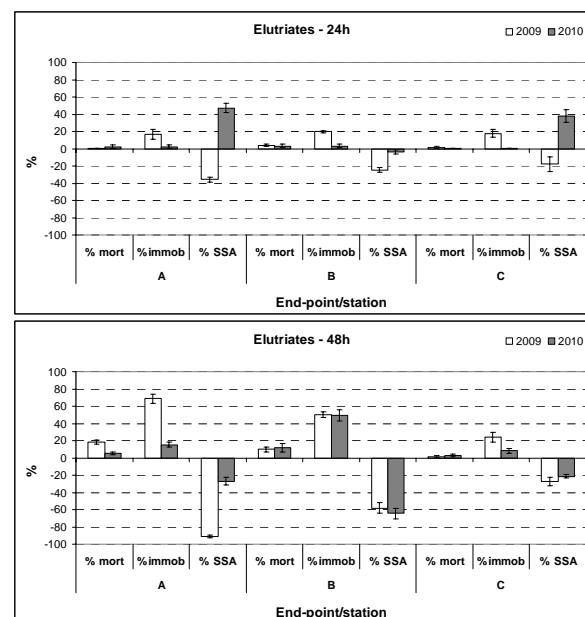


Fig. 1. Mortality, immobilization and swimming speed alteration (SSA) percentages ( $M \pm SE$ ) obtained with nauplii of *A. amphitrite* exposed for 24 and 48 hours to sediment elutriates from three sampling stations (A, B, C). White bars represent results obtained from samples collected in 2009, grey bars from samples collected in 2010.

Results obtained by exposing larvae to elutriates for 24 and 48 hours put in evidence how the sub-lethal end-points swimming speed alteration (SSA) and larval immobilization are much more sensitive respect to the acute toxicity end-point (mortality), as SSA and immobilization percentages are always higher than mortality ones (SSA percentages are negative as they are referred to an inhibition of larval swimming speed respect to control).

Between the two sub-lethal end-points, swimming speed alteration is, in some cases, more sensitive respect to immobilization, thus indicating how this test is able to detect sediment toxicity at lower levels respect to mortality and immobilization assays.

This effect is better evidenced after 24 hours of larval exposure, indicating that this exposure time is the most representative to put in evidence the onset of a sub-lethal stress.

For all three stations sampled it is possible to observe a general improvement of sediment toxicity from year 2009 to 2010, as sediments collected in 2010 are characterized by a lower toxic effect. This improvement is in particular evidenced by sub-lethal end-points (SSA and immobilization), while the observation of just the acute toxicity end-point (mortality) would have caused the loss of this information.

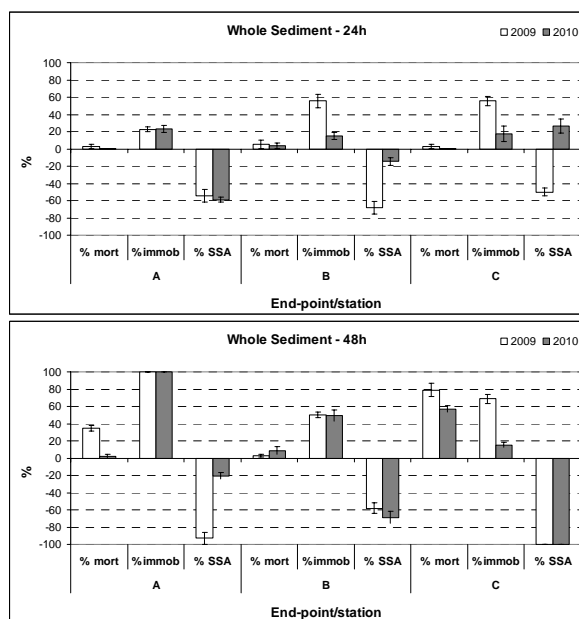


Fig. 2. Mortality, immobilization and swimming speed alteration (SSA) percentages ( $M \pm SE$ ) obtained with nauplii of *A. amphitrite* exposed for 24 and 48 hours to whole sediment from three sampling stations (A, B, C). White bars represent results obtained from samples collected in 2009, grey bars from samples collected in 2010.

As regards data obtained by exposing larvae to whole sediment for 24 and 48 hours, the same considerations can be made as for elutriates results: sub-lethal end-points are always much more sensitive respect to mortality, pointing out toxic effects where the observation of just the acute end-point did not evidence any response.

A comparison between elutriates and whole sediment results put in evidence an higher toxic effect of these latter for all sampling sites, both after 24 and 48 hours of larval exposure.

#### 4. CONCLUSION

In this work we have shown the possibility of optimizing sediments sample analysis and obtaining, by the use of a multi-endpoints bioassay, three end-points characterized by different levels of sensitivity. In the case study shown in this

work, we have been able to detect sediment toxic effects also at very low levels, not detectable by the use of just an acute toxicity end-point such as mortality.

The use of *A. amphitrite* larvae has many advantages, such as high sensitivity and a relative easiness of laboratory rearing. The proposed bioassay does not present excessively high costs for its performance.

Research, development, and applications will continue, driven, among other factors, by the imperative need for cost effectiveness in environmental programs. Research in the fields of ecotoxicology, should provide interesting breakthroughs to further enhance the specificity and diagnostic value of bioassays.

#### REFERENCES

- Faimali M., Garaventa F., Piazza V., Greco G., Corrà C., Magillo F., Pittore M., Giacco E., Gallus L., Falugi C., Tagliaferro M.G., 2006. Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* (Darwin) as a behavioural end-point in toxicological bioassays. *Mar. Biol.* 149(1): 87-96.
- Moiseenko T.I., 2008. Aquatic Ecotoxicology: Theoretical Principles and Practical Application. *Water Resources* 35(5): 530-541.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 552, 247-268.

# Caratterizzazione e individuazione dei quantitativi contaminati di sedimento fluviale nel bacino del fiume Cecina da sottoporre a trattamento sperimentale.

Pilato F. <sup>a</sup>, Secci M. <sup>a</sup>, Macchia S. <sup>a</sup>, Sartori D. <sup>a</sup>, Oliviero L. <sup>b</sup>, Scerbo R. <sup>c</sup>, Benedettini G. <sup>d</sup>, Vigna Guidi F. <sup>d</sup>.

<sup>a</sup> ISPRA – fabiano.pilato@isprambiente.it

<sup>b</sup> Autorità Portuale di Livorno, Livorno

<sup>c</sup> CIBM, Centro Interuniversitario di Biologia Marina, Livorno

<sup>d</sup> ARPAT, Dipartimento di Pisa

## Abstract:

**This study was carried out in order to evaluate, along the Cecina basin, the reference chemical values related to different environmental risk levels derived from the most recent ecotoxicological standards. So, data on sediment chemistry and toxicity tests have been elaborated. Quality sediment assessment was used to characterize specific polluted area whose sediments can be experimentally treated to remove pollutions or otherwise to be restored to get ride off environmental risk.**

**Keywords:** Sediment Quality Assessment, toxicity test, sediment treatment.

## INTRODUZIONE

Il bacino del fiume Cecina racchiude ambienti di notevole valore naturalistico accompagnati da aree pesantemente compromesse in conseguenza dell'immissione di sostanze inquinanti di origine industriale e dall'eccessivo prelievo della risorsa idrica. Le attività produttive maggiormente responsabili della contaminazione chimica del fiume sono individuabili nello sfruttamento dell'energia geotermica, nell'attività estrattiva e nella lavorazione di salgemma e minerali. I processi estrattivi e industriali hanno portato all'immissione, nell'ecosistema fluviale, di quantità rilevanti di metalli pesanti ed altri elementi, tra i quali mercurio, arsenico e boro. Alla contaminazione chimica si aggiunge l'eccessivo emungimento di acqua per uso industriale ed irriguo che, riducendone la portata, intacca fortemente le capacità di autodepurazione del fiume, aggravando i problemi legati all'inquinamento.

Considerato, quindi, lo stato qualitativo ambientale in cui versa attualmente il fiume Cecina, ed in considerazione della veste di bacino idrografico di riferimento in ambito nazionale (D.Lgs. 152/99) e comunitario (Water Frame Directive della Comunità Europea, Direttiva Europea 2000/60), è nata l'esigenza di attuare programmi di risanamento ambientale a medio e lungo termine in relazione agli obiettivi di qualità ambientale che, sulla base delle suddette norme, devono essere raggiunti entro il 2016.

Particolare attenzione è stata riservata al comparto sedimenti, possibile matrice di immagazzinamento degli elementi di maggiore impatto; a tal fine, sono state condotte indagini ambientali, quali l'analisi granulometrica e chimica dei sedimenti, ed i tests di tossicità con varie specie sia su matrici solide che elutriati, al fine di rispondere a due obiettivi principali:

1. Individuazione di valori chimici di riferimento (almeno per Hg, As e B) elaborati sulla base dei più recenti criteri ecotossicologici, secondo quanto previsto dalle direttive europee (76/464/CEE e

2000/60/CE), corrispondenti a diversi livelli di rischio ambientale che possano essere utilizzati per un più generale piano di risanamento ambientale.

2. Individuazione di aree particolarmente compromesse i cui sedimenti siano da sottoporre ad attività di trattamento sperimentale, finalizzate all'abbattimento e/o rimozione di quelle sostanze inquinanti particolarmente a rischio, nonché di aree sulle quali poter ipotizzare interventi differenti.

## MATERIALI E METODI

E' stata realizzata una campagna di verifica generale su tutto il bacino del Fiume Cecina, nella quale sono stati prelevati 44 campioni di sedimento fluviale sia dalle aree considerate a maggiore rischio ambientale, sia da aree a minor impatto, oggetto di una caratterizzazione fisica, chimica ed ecotossicologica, secondo le seguenti metodologie analitiche. La determinazione analitica dei metalli (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) sia per i sedimenti sia per gli organismi, una volta mineralizzati, è effettuata mediante l'impiego di Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico in fornetto di grafite (Varian Spectra AA 200 Z).

L'analisi del mercurio è stata effettuata mediante analizzatore automatico di mercurio (AMA 254, Altec) una tecnica spettrofotometrica di assorbimento atomico specifica che raggiunge limite di rilevabilità pari 0.05 ng di Hg. È stata inoltre condotta l'attività di speciazione di mercurio ed arsenico nelle aree potenzialmente a maggior criticità. La speciazione è un'approccio molto diffuso per valutare il potenziale impatto ambientale degli inquinanti che, contrariamente agli elementi in traccia di origine naturale, sono presenti nelle matrici ambientali in forme chimiche più labili e in seguito a modificazioni dei parametri chimico-fisici dell'ambiente (pH, potenziale di ossido-riduzione, salinità) possono essere rilasciati nella colonna d'acqua con conseguente aumento della loro mobilità e biodisponibilità.

Le frazioni granulometriche sono state determinate utilizzando circa 70 g di sedimento, trattati in soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (1:8), successivamente vagliato con pile di setacci da 2000, 1000, 500, 250, 125 e 63 µm della serie ASTM.

Il test con *Daphnia magna* è stato eseguito secondo quanto descritto nel metodo 8020 del manuale APAT-CNR-IRSA "Metodi analitici per le acque" del 2003 usando neonati ottenuti dalla schiusa di uova in dormienza (ephippium).

Per il saggio su elutriato con *Vibrio fischeri* (manuale APAT-CNR-IRSA 2003, metodo 8030) sono stati usati batteri liofilizzati e congelati riattivati secondo le specifiche della ditta produttrice. La lettura della bioluminescenza è stata eseguita a 5, 15 e 30 minuti; dei tre risultati è stato riportato

quello con maggiore effetto tossico. I valori di EC<sub>xx</sub> sono stati calcolati usando il software MicrotoxOmni.

Il test in fase solida con *Vibrio fischeri* (manuale ICRAM – Appendice 2 Metodi Analitici di Riferimento - 2001) è eseguito incubando la sospensione batterica direttamente a contatto con il sedimento. La lettura al luminometro è stata eseguita dopo 30 minuti di incubazione. Nel caso di accertata tossicità nel campione, è stata effettuata la correzione pelitica, al fine di eliminare la “tossicità naturale” associata alla percentuale di pelite (frazione <63µm) nel sedimento. Il livello di tossicità acuta del sedimento risulta, quindi, esprimibile come STI (Sediment Toxicity Index).

Il test con *Heterocypris incongruens* (Ostracodtookit, della ditta MicroBioTest, Gent Belgio – Procedura in corso di approvazione come metodo ISO) è eseguito usando organismi neonati. Prima dell’allestimento del test sono stati misurati 10 individui per valutare la lunghezza media. Successivamente sono stati preparati i pozzetti contenenti ciascuno 1000µL di sedimento, 4 mL di acqua standard, una sospensione algale (necessaria come alimento durante l’esecuzione del test) e 10 ostracodi. Ogni campione è stato allestito con sei repliche ed associato ad un controllo negativo. Al termine del periodo di incubazione di 6 giorni a 25°C è stata valutata la mortalità e l’eventuale inibizione della crescita rispetto al controllo.

Il saggio con *Corophium orientale* è stato eseguito secondo le metodiche riportate in “ISO 2003. Water Quality - Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediments to amphipods” e secondo Bigongiari et al. (2001). La valutazione qualitativa dei sedimenti è stata effettuata tenendo conto sia della differenza matematica (Δm) che statistica (p<0,05) tra la mortalità ritrovata nel campione da saggiare e la mortalità nel controllo. La sensibilità degli anfipodi è stata valutata determinando il valore di LC<sub>50</sub> (concentrazione alla quale si verifica la morte del 50 % degli individui) con il cloruro di cadmio.

## RISULTATI

I risultati ottenuti dalle attività analitiche sono stati oggetto di elaborazione e valutazione sulla base dei criteri e dei valori chimici di riferimento riportati nel *Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini* APAT-ICRAM (2006), oltre che sottoposti ad un’attenta valutazione delle interazioni tra organismi utilizzati e fattori ambientali specifici dei siti di campionamento.

In base alla combinazione delle risposte ecotossicologiche e delle concentrazioni degli inquinanti ricercati sono state individuate 3 macroaree con maggiori criticità ambientali caratterizzate da sedimenti con elevate concentrazioni in metalli pesanti ed evidenti segnali di tossicità: le macroaree “Possera”, “Botro Grande - S.Marta” e “foce del Fiume Cecina” (vedi figura 1).

La macroarea “Possera” presenta sedimenti con elevate concentrazioni di As e Hg e tossicità acuta e cronica nei tests eseguiti con *Heterocypris*, *Corophium* e *Vibrio*. La contaminazione del torrente Possera influisce negativamente sulla qualità del tratto del Fiume Cecina prossimo all’immissione, infatti, nel punto di campionamento a valle della confluenza, si trovano concentrazioni di As 2,5 volte superiori rispetto al punto di campionamento a monte dell’immissione. Nel punto a valle della confluenza troviamo anche una moderata tossicità sia nella fase acquosa con *Daphnia* che nella fase solida con *Heterocypris*.

La macroarea del “Botro Grande - S. Marta” risulta caratterizzata, nell’area del Botro S. Marta, da una elevata contaminazione da Hg e Zn mentre nell’area del Botro Grande da contaminazione da As e Cu (fino a 3044,7mg/Kg).

I sedimenti di entrambe le aree presentano una elevata tossicità con *Corophium* e *Vibrio* (fase solida). Questi apporti inquinanti influenzano la qualità del fiume Cecina fino al punto di immissione del fiume Trossa.

Infine, la macroarea “foce del Fiume Cecina” risulta contaminata da As, Cr e Ni. Questa area presenta una forte alterazione della qualità ambientale dovuta ad un elevato impatto antropico in prossimità della foce e dalla presenza di un’area industriale poco prima dello sbocco in mare del fiume.

Inoltre, è presente un punto di campionamento sul fiume Trossa che presenta valori elevati di Hg e Cr. Questi dati sono giustificabili sia dalla natura geologica del luogo, sia da pregresse attività estrattive di solfuri.

Oltre a fonti di inquinamento più o meno puntuali dovuti ad attività estrattive o industriali prevalentemente pregresse, il fiume Cecina presenta contaminazione da Cr e Ni sull’intero bacino. Questa contaminazione è verosimilmente da ricondurre alla natura geologica dell’area. Infatti, le rocce serpentينية, abbondanti in tutto il bacino, presentano minerali con Cr e Ni che arricchiscono con questi metalli i sedimenti alluvionali (Franceschini et al.; 2010).

Alcune delle concentrazioni rilevate in questa campagna di campionamento sono risultate inferiori rispetto ai dati di un precedente progetto di ricerca condotto sul bacino del Cecina da Arpat e CNR di Pisa (Scerbo et al., 2005), probabilmente a causa della riduzione di immissione di mercurio nel corso d’acqua e/o di altri interventi lungo l’asta del fiume anche a seguito dell’accordo di programma per l’applicazione della direttiva 2000/60/CE stipulato nel 2003. Permane, comunque, la situazione di criticità nel S. Marta, con valori di mercurio notevolmente superiori a 1 mg/kg.

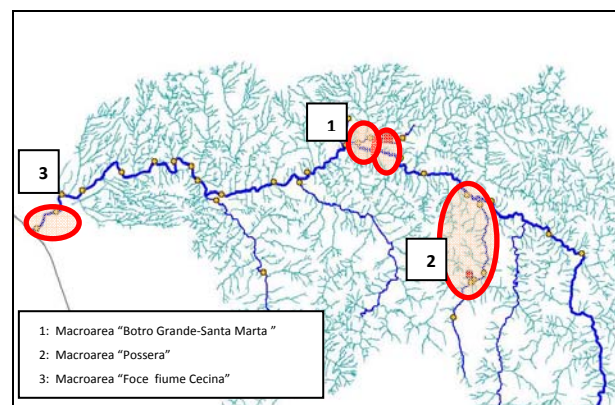


Figura 1: Bacino del Fiume Cecina

## CONCLUSIONI

L’utilizzo integrato di analisi chimiche e ecotossicologiche ha consentito una valutazione complessiva della qualità dei sedimenti analizzati, consentendo l’individuazione di aree con criticità ambientali omogenee.

A conclusione della prima fase progettuale, volta all’individuazione delle macroaree, è attualmente in corso la fase di approfondimento, in cui, dalle prime analisi già condotte, risulta confermata l’omogeneità qualitativa dei sedimenti all’interno di ciascuna macroarea. Il passaggio successivo è quello di individuare quantitativi sperimentali di sedimento fluviale da avviare a processi di trattamento (ultima fase del progetto), finalizzati alla rimozione e/o all’abbattimento degli inquinanti.

## **BIBLIOGRAFIA**

- APAT-ICRAM (2006) – *Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini*.
- APAT- CNR-IRSA (1993) - Metodo 8020. In: *Metodi analitici per le acque*, Manuale 29/03 volume terzo: 993-1002.
- APAT- CNR-IRSA (1993) - Metodo 8030. In: *Metodi analitici per le acque*, Manuale 29/03 volume terzo: 1003-1012.
- Franceschini F., Laterza V. (2010) – *Chromium and Nickel occurrence in soils and sediments of Cecina Valley, Italy*. – Atti dell'85° Congresso della Società Geologica Italiana.
- Schuytema G.S., Nebeker A.V., Stutzman T. W., (1997) *Salinity tolerance of Daphnia magna and potential use for estuarine sediment toxicity tests*. Arch. environ. contam. toxicol., **33** (2): 194-198.
- MicroBioTestsInc – Ostracodtoxkit F – Standard Operational Procedure.
- Scerbo R., Ristori T., Stefanini B., De Ranieri S., Barghigiani C. (2005). *Mercury assessment and evaluation of its impact on fish in the Cecina river basin (Tuscany, Italy)*. Environ. Poll., 135: 179-186.
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. (1979). *Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals*. Anal. Chem., 7, 844-851.
- Bigongiari N., Braidà T., Pasteris A. (2001). *Saggio biologico con l'anfipode Corophium orientale: metodiche ed esempi di applicazione ai sedimenti marini*. Biol. Mar. Medit., 8(2): 60-71.
- ISO (2005). *Water Quality: Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediments to amphipods*. ISO method 16712.

# Utilizzo delle triadi di qualità dei sedimenti per una valutazione integrata nella condotta di scarico a mare dell'impianto di depurazione di Staranzano (Golfo di Trieste)

F. Tamberlich <sup>a,\*</sup>, A. Acquavita <sup>a</sup>, I.F. Aleffi <sup>a</sup>, J. Falomo <sup>b</sup>, L. Faresi <sup>a</sup>, S. Predonzani <sup>b</sup>, G. Mattassi <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Arpa FVG, Osservatori Alto Adriatico, 34139, Trieste, Italia – francesco.tamberlich@arpa.fvg.it

<sup>b</sup> Arpa FVG, 34139, Trieste, Italia

<sup>c</sup> Arpa FVG, 33057, Palmanova (UD), Italia

**Abstract** – Uno dei problemi più sentiti negli ambienti marini costieri interessati dalla presenza di condotte sottomarine è quello di quantificare la loro influenza, soprattutto nei sedimenti che si trovano in prossimità dei diffusori. In questo studio, si è utilizzato l'approccio multidisciplinare del Sediment Quality Triad (SQT) per determinare la qualità del sedimento influenzato da una condotta sottomarina e si sono messi confronto i periodi prima e dopo l'entrata in funzione dell'impianto.

**Keywords:** Sediment Quality Triad, condotte sottomarine.

## 1. INTRODUZIONE

La realizzazione di condotte sottomarine consente di trasferire al largo reflui urbani e/o industriali, preventivamente sottoposti a depurazione. L'immissione di scarichi in aree costiere, caratterizzate da una limitata profondità e da scarso ricambio, può produrre effetti negativi all'ambiente come l'incremento della trofia, la diminuzione della concentrazione di ossigeno disciolto e l'aumento delle deposizioni sul fondo. Le notevoli concentrazioni batteriche, presenti nei reflui urbani possono, inoltre, limitare l'utilizzazione delle risorse influenzando la qualità dell'acqua per la balneazione e la qualità igienico-sanitaria del pescato. Nel caso di scarichi industriali, le sostanze chimiche, organiche ed inorganiche, sebbene presenti in concentrazioni estremamente limitate come regolamentato dall'attuale legislazione, possono, a lungo andare, accumularsi negli organismi o nel sedimento e rappresentare un rischio per la salute pubblica e per l'ambiente. Quando tali composti si accumulano nel sedimento, la loro forma chimica può venir modificata da processi biologici, quali la degradazione microbica e la bioturbazione, o da processi chimici che ne modificano la biodisponibilità. Le influenze antropiche sull'ambiente non inducono, peraltro, sempre modificazioni macroscopiche immediatamente rilevabili a breve termine. L'adattamento degli organismi e l'effetto tamponante del sistema marino consentono, infatti, il superamento rapido delle fasi acute di stress e soltanto una cronicizzazione dei fenomeni negativi può determinare alterazioni negli equilibri del sistema. Una corretta interpretazione delle influenze antropiche sull'ambiente, come quelle prospicienti ai diffusori delle condotte sottomarine, deve tener conto di una visione integrata dell'ecosistema che porti alla costruzione di modelli revisionali a partire da dati chimici, biologici ed ecotossicologici. Il modo più efficace per determinare la qualità del sedimento è quello proposto da Chapman (1990) e definito "Sediment Quality Triad" (SQT). Tale indice risulta ampiamente utilizzato per valutare la qualità dei sedimenti marini attraverso l'analisi integrata di tre diverse componenti: le caratteristiche chimiche del sedimento, che rappresentano una misura della contamina-

zione; i test di tossicità, che misurano la biodisponibilità e gli effetti da un punto di vista biologico ed, infine, la struttura della comunità macrobentonica. L'informazione fornita da ciascuna componente è unica e complementare. L'analisi di tutte e tre le variabili è essenziale per determinare la qualità del sedimento, nessuna di queste, infatti, se considerata singolarmente può offrire un'informazione completa. Per valutare i possibili effetti della messa in funzione di una condotta a mare, è indispensabile esaminare la situazione ambientale pregressa per ottenere un quadro funzionale del sistema e costituire un bianco sul quale verificare, mediante l'indice SQT, l'eventuale degrado apportato dalla condotta. L'area in esame è situata nella parte settentrionale del Golfo di Trieste, al limite esterno della Baia di Panzano ed in prossimità della foce del Fiume Isonzo che, con i suoi apporti, influenza le caratteristiche sedimentologiche ed idrologiche della zona. La profondità è compresa tra 12,5 e 16 metri. L'idrodinamismo della zona è determinato, come per il resto del Golfo, dalla corrente di gradiente di provenienza medio-orientale che imprime un moto in senso antiorario soprattutto agli strati intermedi e di fondo.

## 2. METODI

Nelle tabb. 1-2 ed in fig. 1 vengono riportate le stazioni monitorate ed i parametri analizzati tra il 2003 ed il 2009

Tabella 1. Stazioni di campionamento.

Stazione	Profondità (m)	Lat	Long	Posiz risp diffusore
DO	14	N 45-42,0849	E 13-35,4143	al centro del diffusore
D1	12,5	N 45-42,5027	E 13-35,2655	a 50m
D2	14	N 45-42,0988	E 13-35,4473	a 50m
D3	15	N 45-41,6684	E 13-35,5696	a 50m
D4	14	N 45-42,0741	E 13-35,3791	a 50m
D5	14	N 45-42,0634	E 13-35,3438	a 100m
D6	14	N 45-42,1127	E 13-35,4803	a 100m
D7	13,5	N 45-41,9775	E 13-35,0620	a 500m
D8	15	N 45-42,1640	E 13-35,7830	a 500m

\* Corresponding author. Via Lamarmora 13 Trieste, tel +390409494929 fax +390409494944



D9	16	N 45- 41,4361	E 13- 35,6666	a 500m
----	----	------------------	------------------	--------

Tabella 2. Parametri analizzati nelle 10 stazioni tra il 2003 ed il 2009.

	Parametri sedimento
Settembre 2003	Granulometria, C.org, N.tot, metalli pesanti, IPA, PCB, Macroinvertebrati bentonici, Test di tossicità
Marzo 2005	Granulometria, C.org, N.tot, metalli pesanti, IPA, PCB, Macroinvertebrati bentonici, Test di tossicità
Aprile 2006	Granulometria, C.org, N.tot, metalli pesanti, PCB, Macroinvertebrati bentonici, Test di tossicità
Aprile 2009	Granulometria, C.org, N.tot, metalli pesanti, IPA, PCB, Macroinvertebrati bentonici, Test di tossicità

I campioni per le analisi chimiche, sedimentologiche e per i test tossicologici sono stati raccolti utilizzando un carotatore automatico modello Haps Frame-Supported Bottom Corer (KC Denmark Research Equipment). I campionamenti per l'analisi dei macroinvertebrati bentonici sono stati effettuati con una benna tipo Van Veen, con una superficie di presa pari a 0,1 m<sup>2</sup>.

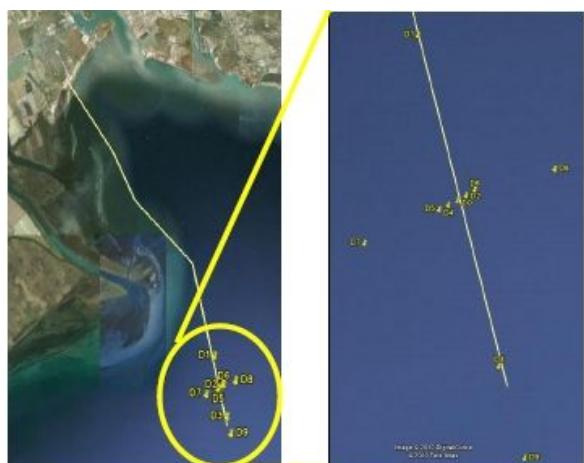


Figura 1. Mappa delle stazioni.

Le analisi granulometriche e di carbonio organico ed azoto totale sono state eseguite utilizzando rispettivamente un granulometro laser (Malvern multisizer 2000S) ed un analizzatore elementare (Perkin Elmer 2400CHNS/O). L'analisi dei metalli è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro ad assorbimento atomico (AAS 5100PC, Perkin Elmer) dotato di atomizzatore in fiamma (FAAS) per la determinazione di Zn, fornetto di grafite (GFAAS) per la determinazione di Cd, Pb, Ni e sistema per lo sviluppo degli idruri (MHS 15, Perkin Elmer) per la determinazione di As. Sono stati monitorati 16 idrocarburi policiclici aromatici indicati nel Decreto 14 aprile 2009 n.56 del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare ed inclusi dall'U.S. Environmental Protection Agency nella lista degli inquinanti prioritari. La determinazione strumentale è stata effettuata con un gascromatografo

(Agilent 6890) accoppiato ad uno spettrometro di massa (Agilent 5973N, tecnica GC/MS).

Sono stati considerati 7 congeneri di policlorobifenili (ICRAM, 2001). Negli anni 2003, 2005 e 2006 l'analisi strumentale è stata effettuata mediante un gascromatografo (Perkin Elmer Autosystem XL) munito di detector ECD. Nel 2009 i PCB sono stati ricercati e quantificati con tecnica GC/MS in modalità SIM.

Per i macroinvertebrati bentonici in ciascuna stazione sono state raccolte tre bennate, setacciate con una maglia di 0,5 mm, il materiale residuo è stato fissato in formalina al 4%. I dati ottenuti sono stati elaborati calcolando i principali indici biotici univariati quali l'indice di diversità specifica ( $H'_{log_2}$ ) (Shannon e Weaver, 1949), di equitabilità ( $J'$ ) (Pielou, 1966) e l'indice di Simpson (1949).

Per i test di tossicità il saggio con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri* è stato effettuato sulla fase solida centrifugata secondo i protocolli standard Azur Environmental 1994, modificati da Onorati *et al.* (1999). Il saggio con la microalga *Dunaliella tertiolecta*, sull'acqua interstiziale, è stato realizzato secondo le metodiche ARPAT (1998).

Per il calcolo dell'indice di qualità del sedimento, si è scelto di operare come proposto da altri autori (Chapman 1990, 1996, 2000; DelValls *et al.*, 1998), considerando per la chimica gruppi di contaminanti (metalli, IPA, PCB), per la tossicità si è utilizzato l'indice di tossicità del sedimento (STI) nel test in fase solida con *Vibrio fischeri*, mentre per il test con *Dunaliella tertiolecta* si è dovuto in qualche modo trasformare i giudizi sugli effetti (tossico, non tossico ed eutrofizzante) in numeri. Per valutare l'alterazione si sono usate le percentuali dei gruppi tassonomici più significativi e gli indici di diversità.

Per poter utilizzare lo strumento degli "indici di ricapitolazione" è necessario comparare dati adimensionali, su basi quantitative, che possano esser paragonati ed eventualmente sommati anche quando, ci siano differenze nelle unità di misura.

Chapman (1996) propone una normalizzazione dei dati rispetto ai valori di un sito di riferimento. I dati (concentrazioni dei contaminati, risultati degli indici ecologici e risultati dei saggi di tossicità) vengono convertiti in valori dati dai rapporti rispetto al sito di riferimento (RTR);

$$(RTR)_k = (V_i)_k / (V_i)_0 \quad (1)$$

dove  $(RTR)_k$  = rapporto di riferimento per il parametro i-esimo al sito k-esimo

$(V_i)_k$  = dato determinato dal parametro i-esimo al sito k-esimo.

$(V_i)_0$  = dato determinato per il parametro i-esimo al sito scelto come riferimento

Per i valori di contaminazione e di tossicologia il calcolo è diretto, invece per i parametri di alterazione biologica si è scelto di usare i parametri trasformati nei loro reciproci, per mostrare un incremento in seguito all'alterazione.

I rapporti così ottenuti per tutti i parametri vengono sommati al fine di ottenere per ogni sito: un indice di contaminazione (IC), un indice di tossicità (IT) ed un indice di alterazione (IA).

I valori di RTR calcolati con la metodologia classica sono stati utilizzati con successo in studi precedenti (Chapman 1990), anche se talvolta possono fornire indicazioni imprecise, a causa di un'influenza eccessiva di una misura rispetto alle altre. Per questo motivo si è scelto di



NIArifD1	1.04	1.00	1.12	1.01	1.11	1.12	1.06	1.07	0.98	1.08
<b>PTriade</b>	<b>3.56</b>	<b>3.00</b>	<b>3.18</b>	<b>3.07</b>	<b>3.50</b>	<b>3.52</b>	<b>2.94</b>	<b>3.02</b>	<b>2.868</b>	<b>2.866</b>
NICrifD2	0.84	0.87	1.00	1.03	0.90	0.93	0.92	0.86	1.00	0.90
NITrifD2	1.69	1.10	1.00	0.95	1.49	1.46	0.90	1.06	0.80	0.82
NIArifD2	0.93	0.90	1.00	0.91	0.99	1.00	0.95	0.96	0.88	0.96
<b>PTriade</b>	<b>3.47</b>	<b>2.86</b>	<b>3.00</b>	<b>2.88</b>	<b>3.38</b>	<b>3.39</b>	<b>2.77</b>	<b>2.87</b>	<b>2.68</b>	<b>2.69</b>
NICrifD3	0.82	0.84	0.97	1.00	0.87	0.90	0.89	0.83	0.97	0.88
NITrifD3	1.79	1.16	1.06	1.00	1.57	1.54	0.95	1.12	0.84	0.87
NIArifD3	1.03	0.99	1.10	1.00	1.10	1.10	1.04	1.05	0.97	1.06
<b>PTriade</b>	<b>3.63</b>	<b>2.99</b>	<b>3.13</b>	<b>3.00</b>	<b>3.54</b>	<b>3.55</b>	<b>2.89</b>	<b>3.00</b>	<b>2.79</b>	<b>2.80</b>
NICrifD4	0.94	0.96	1.11	1.15	1.00	1.03	1.03	0.96	1.12	1.01
NITrifD4	1.14	0.74	0.67	0.64	1.00	0.98	0.61	0.71	0.54	0.55
NIArifD4	0.94	0.90	1.01	0.91	1.00	1.01	0.95	0.96	0.89	0.97
<b>PTriade</b>	<b>3.02</b>	<b>2.60</b>	<b>2.79</b>	<b>2.70</b>	<b>3.00</b>	<b>3.02</b>	<b>2.59</b>	<b>2.63</b>	<b>2.54</b>	<b>2.53</b>
NICrifD5	0.91	0.93	1.08	1.11	0.97	1.00	1.00	0.93	1.08	0.97
NITrifD5	1.16	0.75	0.68	0.65	1.02	1.00	0.62	0.72	0.54	0.56
NIArifD5	0.93	0.90	1.00	0.91	0.99	1.00	0.95	0.96	0.88	0.97
<b>PTriade</b>	<b>3.00</b>	<b>2.58</b>	<b>2.76</b>	<b>2.67</b>	<b>2.98</b>	<b>3.00</b>	<b>2.56</b>	<b>2.61</b>	<b>2.51</b>	<b>2.50</b>
NICrifD6	0.92	0.94	1.08	1.12	0.97	1.00	1.00	0.93	1.09	0.98
NITrifD6	1.87	1.22	1.11	1.05	1.65	1.62	1.00	1.17	0.88	0.91
NIArifD6	0.99	0.95	1.06	0.96	1.05	1.06	1.00	1.01	0.93	1.02
<b>PTriade</b>	<b>3.77</b>	<b>3.10</b>	<b>3.25</b>	<b>3.13</b>	<b>3.67</b>	<b>3.68</b>	<b>3.00</b>	<b>3.11</b>	<b>2.90</b>	<b>2.91</b>
NICrifD7	0.98	1.01	1.16	1.20	1.04	1.08	1.07	1.00	1.17	1.05
NITrifD7	1.60	1.04	0.95	0.90	1.41	1.38	0.86	1.00	0.75	0.78
NIArifD7	0.98	0.94	1.05	0.95	1.04	1.05	0.99	1.00	0.92	1.01
<b>PTriade</b>	<b>3.56</b>	<b>2.98</b>	<b>3.16</b>	<b>3.04</b>	<b>3.49</b>	<b>3.51</b>	<b>2.92</b>	<b>3.00</b>	<b>2.84</b>	<b>2.83</b>
NICrifD8	0.84	0.86	1.00	1.03	0.90	0.92	0.92	0.86	1.00	0.90
NITrifD8	2.12	1.38	1.26	1.19	1.87	1.84	1.13	1.33	1.00	1.03
NIArifD8	1.06	1.02	1.14	1.03	1.13	1.13	1.07	1.09	1.00	1.10
<b>PTriade</b>	<b>4.02</b>	<b>3.26</b>	<b>3.39</b>	<b>3.25</b>	<b>3.89</b>	<b>3.89</b>	<b>3.13</b>	<b>3.27</b>	<b>3.00</b>	<b>3.02</b>
NICrifD9	0.94	0.96	1.11	1.14	0.99	1.03	1.02	0.95	1.11	1.00
NITrifD9	2.07	1.34	1.22	1.16	1.82	1.79	1.10	1.29	0.97	1.00
NICrifD9	0.97	0.93	1.04	0.94	1.03	1.04	0.98	0.99	0.91	1.00
<b>PTriade</b>	<b>3.97</b>	<b>3.23</b>	<b>3.37</b>	<b>3.24</b>	<b>3.84</b>	<b>3.85</b>	<b>3.10</b>	<b>3.23</b>	<b>2.99</b>	<b>3.00</b>

A questo punto è possibile confrontare le singole stazioni con quella di riferimento ed effettuare una valutazione dei risultati integrati sulla base degli indici calcolati (Nic, Nit, e Nia). Come proposto da Chapman (1996), per una maggior facilità di comprensione i valori degli indici per ciascun sito vengono indicati su tre scale con origine in comune e vengono riportati i valori di NP triad proposti da DelValls *et al.* (1998) (figg. 3-4).

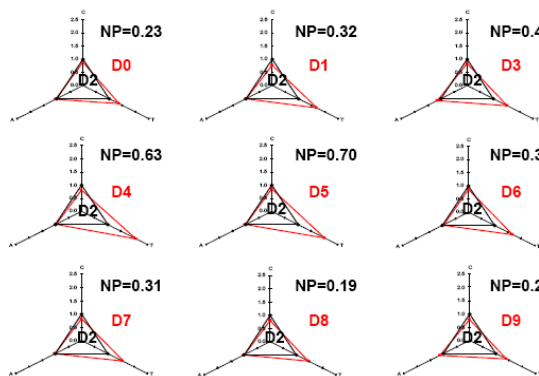


Figura 3. Rappresentazione triangolare dei risultati delle analisi SQT per le varie stazioni rispetto alla stazione D2 (triangolo interno nero) presa come riferimento nel periodo 2003. C, T, A indicano la contaminazione chimica, la tossicità, e l'alterazione ecologica misurate.

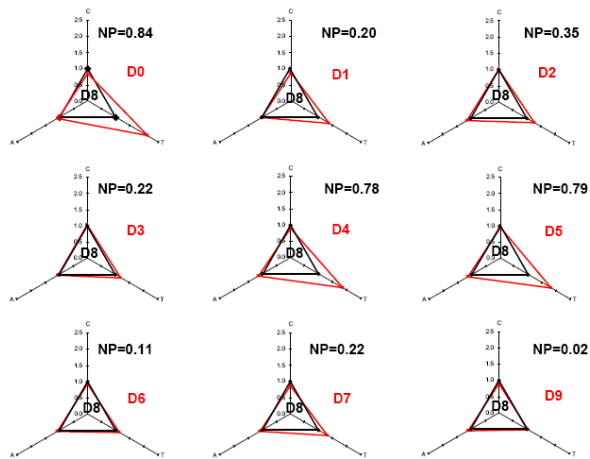


Figura 4. Rappresentazione triangolare dei risultati delle analisi SQT per le varie stazioni rispetto alla stazione D8 (triangolo interno nero) presa come riferimento nel periodo 2005-2009. C, T, A indicano la contaminazione chimica, la tossicità, e l'alterazione ecologica misurate.

Da una prima analisi si nota come non vi sia una grande differenza tra il 2003, anno nel quale la condotta non era ancora in funzione, e il 2005-2009, periodo in cui la condotta era a regime. Dopo la messa in funzione le uniche stazioni ad avere un NP triad maggiore di 0,7 (valore massimo trovato nella stazione D5 nel 2003) sono le stazioni D0, più prossima al diffusore, con un NP triad di 0,84 e le stazioni D4 e D5 con un valore vicino a 0,80. Queste due stazioni sono poste, rispettivamente a 50m e 100m a ovest della stazione D0, opposte alla stazione D8, presa come riferimento. Questa situazione potrebbe far ipotizzare che la circolazione del Golfo, prevalentemente antioraria, e l'Isonzo, influiscano sulla direzione di dispersione dei reflui. Confrontando visivamente i vari rami del triangolo risulta come il ramo relativo alla tossicità abbia un peso maggiore rispetto agli altri due, ad indicare come contaminanti o particolari sinergie che causano una potenziale degradazione, non siano stati presi in considerazione. Degradazione che però sembra appena accennata se si confrontano i vari indici integrati del 2003 con quelli riscontrati in quattro stazioni campionate nel 2000, nella stessa area, prima della costruzione della condotta (Barbieri *et al.*, 2002).

#### 4. CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati delle indagini effettuate nel 2003, prima della messa in funzione della condotta a mare di Staranzano, e da quelle eseguite negli anni successivi (2005, 2006 2009) si notano delle variazioni più o meno evidenti nel tempo, a seconda del parametro considerato. Dall'applicazione del SQT non si notano forti differenze negli anni, anche se, considerando la risposta della tossicità, sembra esserci un leggero stress ambientale. In conclusione l'effetto della condotta non è chiaramente evidenziabile, alcuni elementi sembrano far propendere per una lieve influenza dello scarico, ma è necessario verificare se, la tendenza registrata, verrà confermata nei prossimi anni, in modo da poter distinguere tra la variabilità naturale, legata agli apporti fluviali, che influenzano considerevolmente l'area in esame, ed una

reale contaminazione, dovuta ai reflui provenienti dal diffusore della condotta.

## BIBLOGRAFIA

- ARPAT-CEDIF (1998). "Metodologia di saggio algale per il controllo di corpi idrici e delle acque di scarico". Quaderno n. 8, Firenze, 191 pp.
- Azur Enviromental (1994) "Microtox Acute Toxicity Solid Phase Test Procedures". 66 pp.
- Barbieri, P., P. Busetto, S. Predonzani, F. Aleffi, F. Tamberlich, C. De Vittor, G. Adami e E. Reisenhofer (2002). "On choice of the reference site in sediment quality triads: a study in the Gulf of Trieste". VII Congresso nazionale di chimica ambientale, Venezia, Italia 11- 14 giugno 2002, p. 270.
- Chapman P.M. (1990). "The Sediment Quality Triad approach to determining pollution induced degradation". *Science of the Total Environment* 97/98, pp. 815-825.
- Chapman P.M. (1996). "Presentation and interpretation of Sediment Quality Triad data". *Ecotoxicology*, vol. 5, pp. 327-339.
- Chapman P.M. (2000). "The Sediment Quality Triad: then, now and tomorrow". *International Journal of Environment and Pollution*, vol. 13, pp. 351-356.
- DelValls TA., JM. Forja e A. Gomez-Parra (1998). "Integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Candiz, Spain". *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, no. 6, pp. 1073-1084.
- ICRAM - Ministero Ambiente e Tutela del Territorio (2001) "Metodologie Analitiche di riferimento". A.M. Cicero & I. Di Girolamo (Eds).
- Onorati F., D. Pellegrini e A. Ausili (1999). "Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox in fase solida: la normalizzazione pelitica". *Acqua Aria*, vol 6, pp. 83-89.
- Pielou E.C. (1966). "The measurement of diversity in different type of biological collections". *Journal of Theoretical Biology*, vol. 13, pp. 131-144.
- Shannon C.E. e W. Weaver (1949). "The mathematical theory of communication". Urbana, University of Illinois Press, 117 pp.
- Simpson E.H. (1949). "Measurement of diversity". *Nature*, 163, p. 688.

INDAGINE ECOTOSSICOLOGICA SU ACQUE PROVENIENTI DAI FIUMI TANAGRO E BUSSENTO  
MEDIANTE L'UTILIZZO DI UNA BATTERIA DI TEST

M. Guida<sup>a,\*</sup>, M. Inglese<sup>b</sup>, R.A. Nastro<sup>c</sup>, D. Santafede<sup>d</sup>, S. De Bonis<sup>e</sup>, P. Lo Duca<sup>f</sup>, G. Melluso<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento delle Scienze Biologiche, Napoli, Italy – marco.guida@unina.it

<sup>b</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento delle Scienze Biologiche, Napoli, Italy – minglese@unina.it

<sup>c</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento delle Scienze Biologiche, Italy – r.nastro@alice.it

<sup>d</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento delle Scienze Biologiche, Italy- daniela.santafede@fastwebnet.it

<sup>f</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento delle Scienze Biologiche, Napoli, Italy –

<sup>e</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Italy- deboniss@gmail.com

<sup>g</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Napoli, Italy –  
giomellu@unina.it

- **Abstract – Nell'ambito di un più ampio e completo lavoro di monitoraggio che ha riguardato due fiumi della regione Campania e che scorrono in corrispondenza del Parco Nazionale del Cilento e del Vallo di Diano (patrimonio UNESCO), il Bussento e il Tanagro, è stata condotta un'indagine ecotossicologica mediante l'utilizzo di cinque bioindicatori. Da tale campagna di indagine si è evinto soprattutto la necessità sempre più profonda di applicare i saggi eco tossicologici sia come primo strumento di diagnosi ma soprattutto nell'ambito di una batteria di test idoneamente articolata.**

**Keywords:** ecotossicologia, acque dolci, saggi.

## 1. INTRODUZIONE

Tutti i corpi idrici, attraverso un complesso e delicato sistema di interscambi fra acque e sedimenti suolo e aria, consentono la vita degli organismi viventi, animali e vegetali. La risorsa acqua per definizione viene considerata una fonte "rinnovabile" in quanto la quantità teoricamente disponibile dipende essenzialmente dagli apporti meteorici. Il bilancio idrico globale annuo del terreno italiano indica un afflusso meteorico di 296 miliardi di m<sup>3</sup> di acqua, una perdita del 43% per evapotraspirazione (129 miliardi di m<sup>3</sup>) ed una "risorsa idrica superficiale" pari a 167 miliardi di m<sup>3</sup>, suddivisa in 155 miliardi di m<sup>3</sup> di acque superficiali e 12 miliardi di m<sup>3</sup> sotterranee. Teoricamente, sarebbe quindi a disposizione un volume di circa 2700 m<sup>3</sup> pro capite di acqua per i vari usi. La quantità d'acqua a disposizione sarebbe dunque ampiamente sufficiente a coprire l'intero fabbisogno idropotabile, assumendo però che la sua qualità sia adeguata al suo utilizzo per le diverse attività umane. Ma non è sempre così: ancora prima della nascita del metodo scientifico, l'uomo ha ben presto imparato a stabilire empiricamente quando l'acqua da utilizzare per scopi vari aveva particolari caratteristiche, positive (acque medicamentose) o negative ("acqua cattiva" per l'agricoltura o per l'alimentazione umana ed animale). E, a prescindere da pochi casi di acque fortemente mineralizzate per cause naturali, si è scoperto che solitamente era proprio la presenza stessa di insediamenti abitativi a determinare uno scadimento qualitativo delle acque.

Il Fiume Bussento, che scorre per poco meno di 40 Km, è il più importante fiume che ricade nel territorio del Parco

Nazionale del Cilento e Vallo di Diano (provincia di Salerno, Campania), patrimonio UNESCO dell'Umanità. L'altro fiume monitorato è il Tanagro, principale affluente di sinistra del fiume Sele, che scorre per 92 Km, in gran parte anch'esso nell'area contigua del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano.

Molteplici studi hanno ormai fornito evidenza sperimentale al fatto che il solo approccio chimico-analitico non fornisce gli strumenti sufficienti per definire il rischio ambientale associato ad una miscela di inquinanti. Il ricorso a saggi ecotossicologici consente di valutare da un lato la frazione biodisponibile degli inquinanti, dall'altro eventuali fenomeni di sinergia e/o antagonismo tra sostanze diverse.

Per quanto riguarda le indagini ecotossicologiche, anche queste introdotte dal D. Lvo 152/99 e del tutto trascurate dal nuovo decreto del 2006, restano un valido supporto alle indagini ambientali e al monitoraggio. Per restituire un quadro il più possibile completo ed affidabile della matrice indagata l'approccio ecotossicologico deve essere basato su una batteria di test che impiegano organismi appartenenti a differenti livelli trofici e che comprenda sia test acuti, che cronici.

La valutazione delle tossicità associate ad endpoint diversi incrementa, infatti, il valore predittivo di questi saggi. Quindi lo strumento d'elezione è rappresentato dall'uso di saggi ecotossicologici multispecie, che forniscono una valutazione globale degli effetti dannosi esercitati da miscele inquinanti sugli organismi viventi. Un test di tossicità si fonda sul principio secondo il quale, esponendo un organismo vivente ad un agente tossico, la risposta risulta essere funzione diretta della dose assunta e indiretta del livello di esposizione; quindi, in generale essi vengono descritti da relazioni dose-risposta e da curve attività-effetto. Tale organismo fungerà da bioindicatore.

Si può però prendere come riferimento la definizione di bioindicatore proposta da Iserentant e De Sloover (1976) quale: "*organismo o sistema biologico usato per valutare una modificazione – generalmente degenerativa – della qualità dell'ambiente, qualunque sia il suo livello di organizzazione e l'uso che se ne fa. Secondo i casi il bioindicatore sarà una comunità, un gruppo di specie con comportamento analogo (gruppo ecologico), una specie particolarmente sensibile (specie indicatrice) oppure una porzione di organismo, come organi, tessuti, cellule o anche una soluzione di estratti enzimatici*".

E' prassi ormai consolidata il valutare la tossicità di matrici complesse, quali quelle ambientali, mediante una batteria di

\* Corresponding author. Postal address, telephone & fax ...

bioindicatori, allo scopo di analizzare il più ampio spettro di effetti su organismi con risposte differenti ai vari composti presenti nelle matrici.

La scelta del bioindicatore da utilizzare per i diversi saggi di tossicità dipende dall'obiettivo che si vuole conseguire e dalle caratteristiche peculiari che distinguono gli organismi gli uni dagli altri.

## 2. MATERIALI E METODI

I punti di campionamento sono stati fissati ad una distanza dalle immissioni sufficiente ad avere la garanzia del rimescolamento delle acque al fine di valutare la qualità del corpo recettore e non quella degli apporti. La rete di monitoraggio approntata lungo l'asta fluviale del fiume Bussento è consistita di 14 punti; quella che ha riguardato il fiume Tanagro, invece, di 15 punti di campionamento.

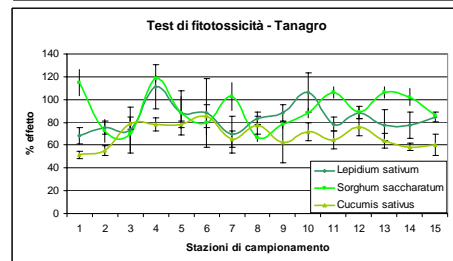
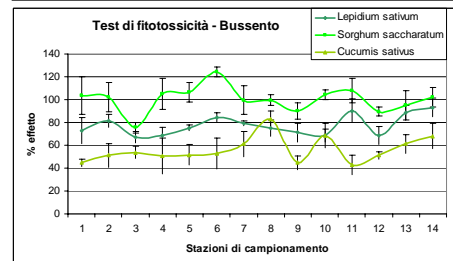
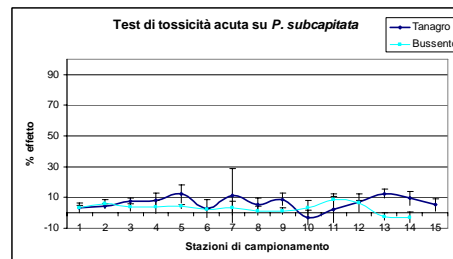
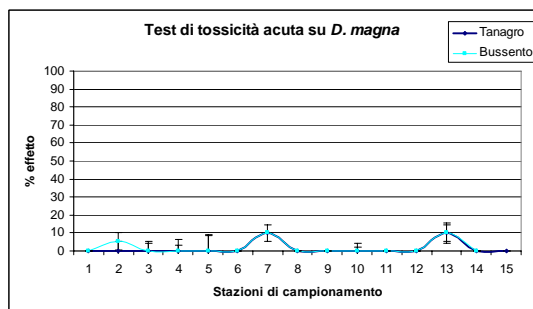
La presente valutazione ecotossicologica è stata condotta mediante l'utilizzo dei bioindicatori *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lepidium sativum*, *Cucumis sativus*, *Sorghum saccharatum*.

## 3. RISULTATI

I saggi di tossicità avuta eseguiti su *Daphnia magna*, per 24 ore di incubazione, non hanno mai fatto registrare percentuali di effetto superiori al 20% sul campione tal quale per tutto il periodo di campionamento. In particolare, i valori medi calcolati per le cinque tornate di campionamento, su entrambe le aste fluviali, non mostrano differenze statisticamente significative rispetto ai controlli, non evidenziando, quindi situazioni di allarme in atto.

I saggi di tossicità cronica eseguiti su *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) presentano valori piuttosto costanti, sia su scala spaziale che temporale, non suggerendo effetti tossici significativamente diversi rispetto ai controlli, nè particolari fenomeni di biostimolazione che possano suggerire fenomeni di eutrofizzazione in atto.

Le indicazioni fornite dai test di germinazione e allungamento radicale condotti su *Lepidium sativum*, *Cucumis sativus* e *Sorghum saccharatum*, concordano con quelle fornite dalle altre due tipologie di test: mostrano, infatti, una situazione che non evidenzia eccessiva biodisponibilità in termini di nutrienti, sebbene due delle specie sottoposte al saggio, *L. sativum* e *S. saccharatum*, rilevino fenomeni di biostimolazione in alcune delle stazioni monitorate. Per nessuno dei campioni prelevati presso le stazioni di monitoraggio è stato possibile estrapolare un valore di EC50, visti gli scarsi effetti registrati.



## 4. CONCLUSIONI

Nessuno dei test eseguiti, né quello acuto, né quelli cronici e sub cronici, ha messo in evidenza situazioni di emergenza per i tratti monitorati, sebbene i risultati dei test di fitotossicità, in particolar modo di quelli condotti su *C. sativus* abbiano fatto registrare moderati effetti di inibizione. Tuttavia, va sottolineato che, nell'ambito delle risposte dei tre bioindicatori vegetali, i valori osservati appaiono più discordi nel caso del fiume Bussento rispetto al fiume Tanagro, pur con andamenti più simili tra crescita e sorgo, rispetto alla risposta fornita dal cetriolo. Dall'analisi dei dati ecotossicologici emersi dalle indagini svolte non appare, quindi, nel complesso evidenziata una situazione di particolare allarme e non parrebbe, quindi, necessario dover ricorrere ad indagini chimiche supplementari. Va sottolineata la necessità di sottoporre i campioni ad una batteria di test eco tossicologici ben organizzata, soprattutto se si tratta di acque interne e dai cui dati è scarsamente rilevabile una risposta diretta e acuta.

Le risposte ottenute dai bioindicatori utilizzati, sono parse coerenti e da qui se ne ricava il giudizio unanime circa il buon stato eco tossicologico di entrambi i corsi fluviali.

### References from Journals

- ISO 6341:1996 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test.
- APAT 8020 Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*, in Metodi analitici per le acque, volume 3 - APAT Manuali e Linee Guida 29/2003.
- ISO 6341:1996 Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae
- US - EPA 1003.0 green alga, *Selenastrum capricornutum*, growth test method.
- Unichim M.U. 1651:2003 - 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).