

VALUTAZIONI SITO-SPECIFICHE NELL'ANALISI DEL RISCHIO ECOLOGICO

Fenoglio S, Negri A, Oliveri C, Oliveri L, Sforzini S

Tiziano Bo, Alessandro Dagnino, Aldo Viarengo



DiSAV, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita
Università del Piemonte orientale "Amedeo Avogadro"

Indice

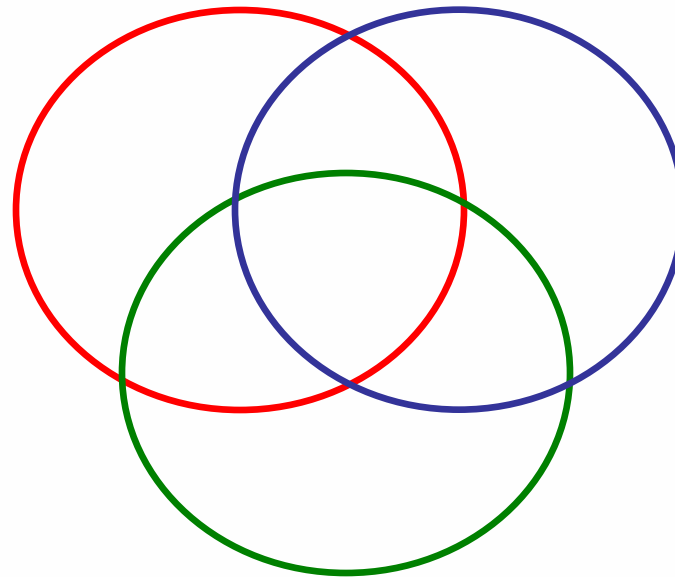
1. L'analisi di rischio ecologico: l'approccio Triad
2. I dati chimici
3. I saggi ecotossicologici: test tradizionali
4. I parametri ecologici e le tecniche di campionamento
5. Integrazione dei risultati: calcolo degli indici di rischio
6. Caso studio: il fiume Bormida
7. Sistemi di valutazione per evidenziare la classe di composti chimici che induce la tossicità
8. Nuove frontiere



Analisi di rischio ambientale: L'approccio Triad

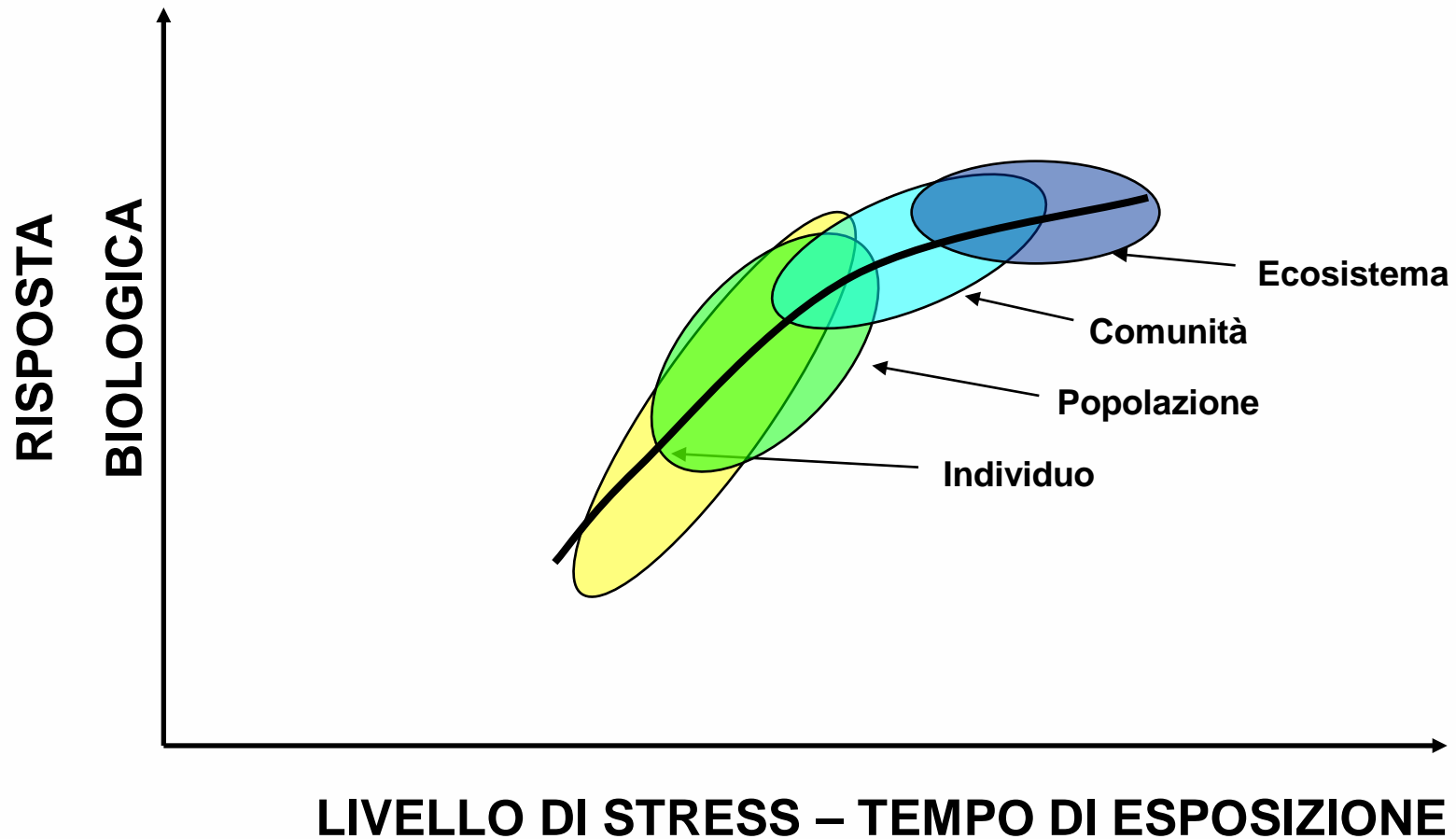
Chimica

Ecotossicologia

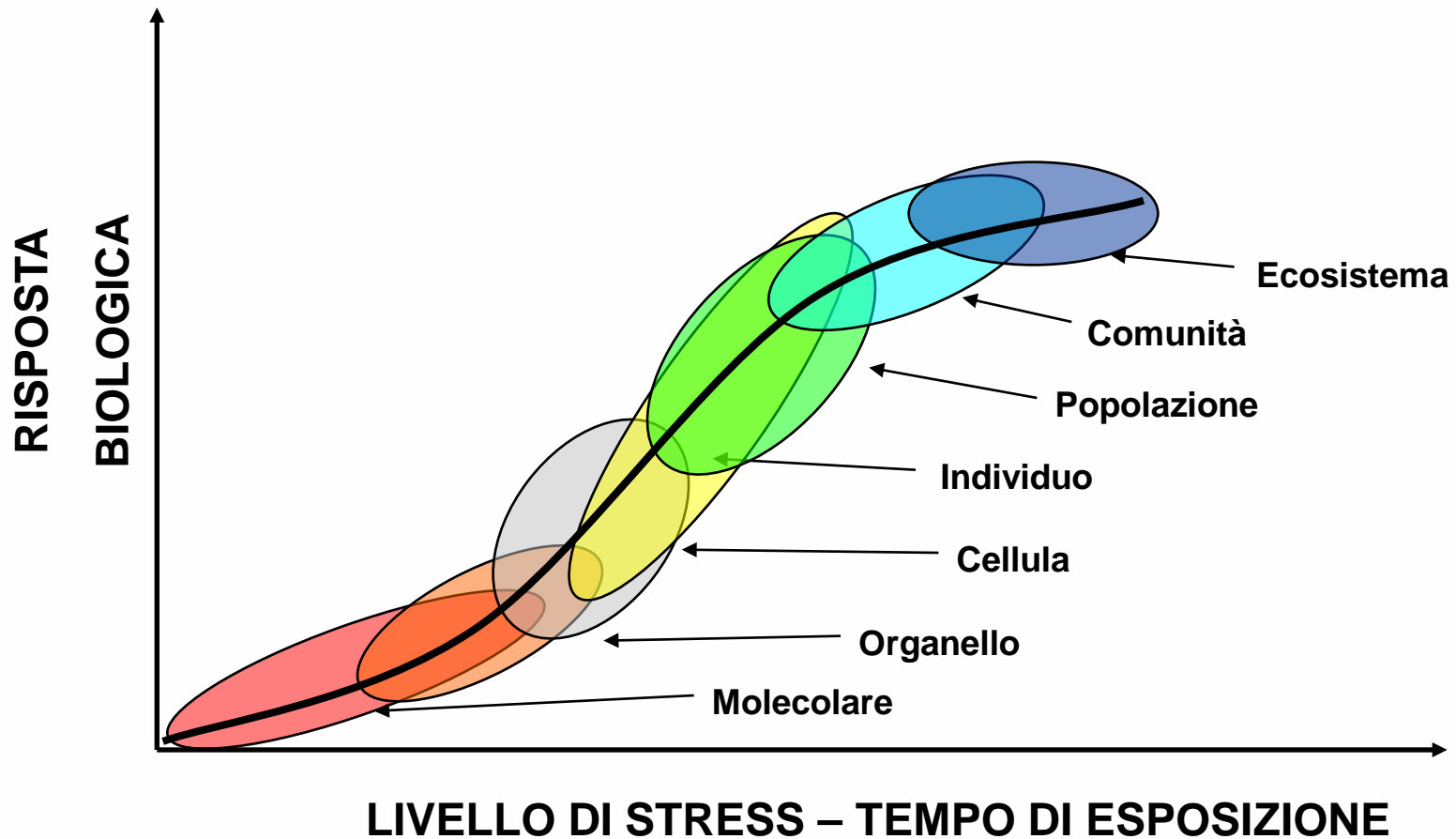


Ecologia

Valutazione degli effetti biologici



Valutazione degli effetti biologici

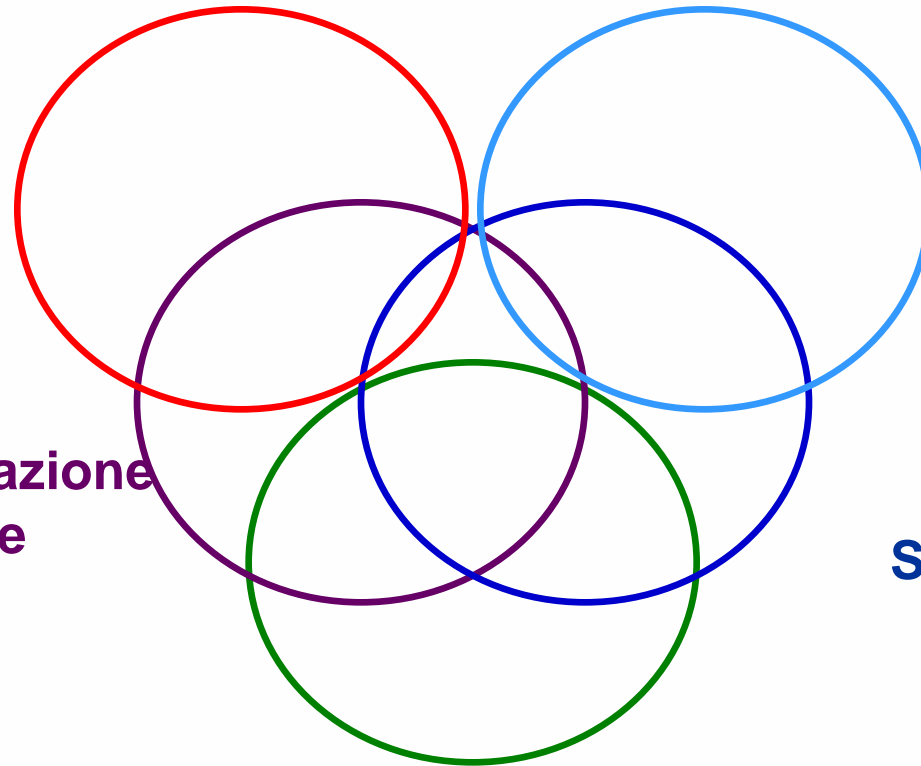




Analisi di rischio ambientale: L'approccio Triad

Concentrazione totale

Biomarker



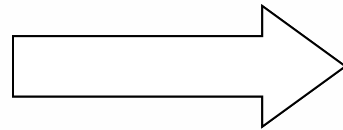
**Concentrazione frazione
biodisponibile**

Saggi biologici

Parametri ecologici

Interpretazione dei risultati

E' corretto mischiare questa eterogenea massa di dati per determinare il rischio?

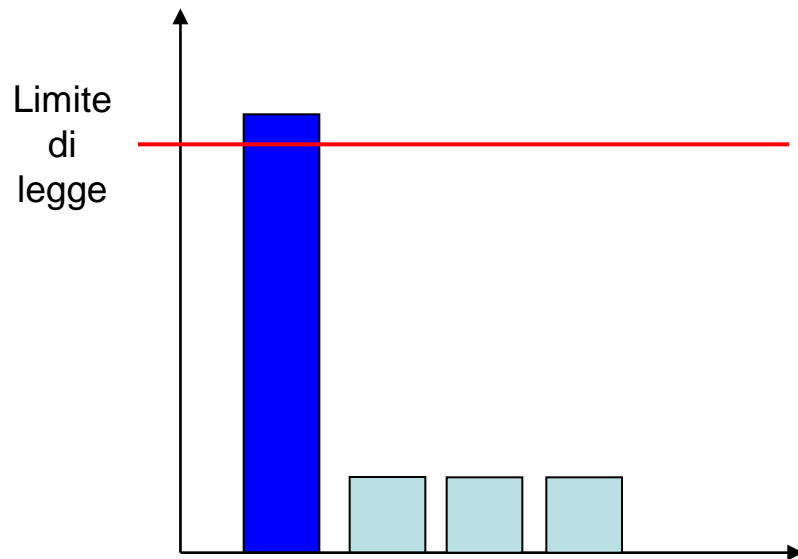


SI'

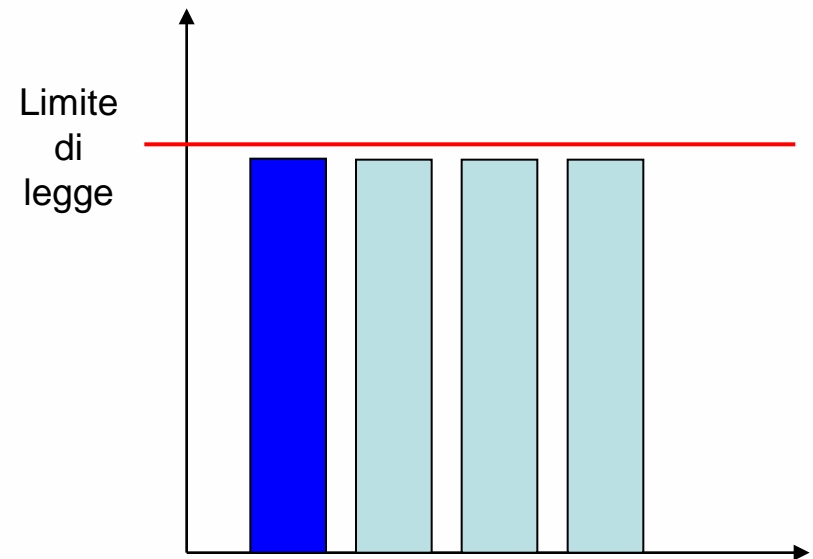
- Pesi differenti alle differenti LoE
- Output differenziati:
 - rischio di declino della biodiversità
 - vulnerabilità biologica

Limiti dell'approccio tabellare

Concentrazione



Concentrazione



Procedura di integrazione

314

 Integrated Environmental Assessment and Management — Volume 4, Number 3—pp. 314–326
 © 2008 SETAC

A “Weight-of-Evidence” Approach for the Integration of Environmental “Triad” Data to Assess Ecological Risk and Biological Vulnerability

Alessandro Dagnino,[†] Susanna Sforzini,[†] Francesco Dondero,[†] Stefano Fenoglio,[†] Elisa Bona,[†] John Jensen,[‡] and Aldo Viarengo*[†]

[†]DISAIV, Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”, via Bellini 25/G, Alessandria (I-15100), Italy
[‡]National Environmental Research Institute, Department of Terrestrial Ecology, PO Box 314, Vejlevej 25, Silkeborg DK-8600, Denmark

(Received 2 October 2007; Accepted 26 March 2008)

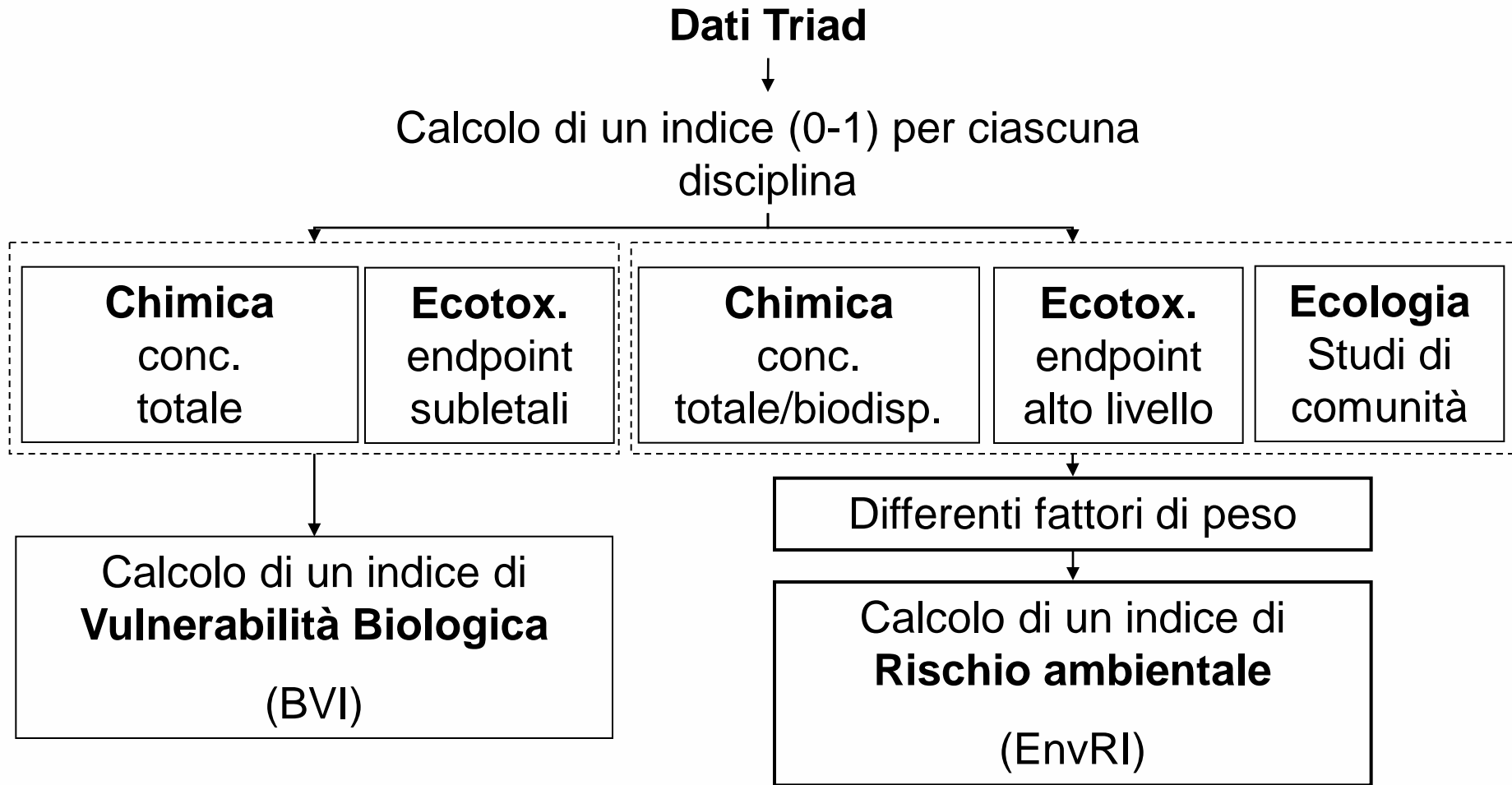
ABSTRACT

A new Expert Decision Support System (EDSS) that can integrate Triad data for assessing environmental risk and biological vulnerability at contaminated sites has been developed. Starting with ecosystem relevance, the EDSS assigns different weights to the results obtained from Triad disciplines. The following parameters have been employed: 1) chemical soil analysis (revealing the presence of potentially dangerous substances), 2) ecotoxicological bioassays (utilizing classical endpoints such as survival and reproduction rates), 3) biomarkers (showing sublethal pollutant effects), and 4) ecological parameters (assessing changes in community structure and functions). For each Triad discipline, the EDSS compares the data obtained at the studied field sites with reference values and calculates different 0–1 indexes (e.g., Chemical Risk Index, Ecotoxicological Risk Index, and Ecological Risk Index). The EDSS output consists of 3 indexes: 1) Environmental Risk Index (EnvRI), quantifying the level of biological damage at population–community level, 2) Biological Vulnerability Index (BVI), assessing the potential threats to biological equilibrium, and 3) Genotoxicity Index (GTI), screening genotoxicity effects. The EDSS has been applied in the integration of a battery of Triad data obtained during the European Union-funded Life Intervention in the Franchetta Area (LINFRA) project, which has been carried out in order to estimate the potential risk from soils of a highly anthropized area (Alessandria, Italy) mainly impacted by deposition of atmospheric pollutants. Results obtained during 4 seasonal sampling campaigns (2004–2005) show maximum values of EnvRI in sites A and B (characterized by industrial releases) and lower levels in site D (affected by vehicular traffic emissions). All 3 potentially polluted sites have shown high levels of BVI and GTI, suggesting a general change from reference conditions (site C).

Keywords: Expert Decision Support System Triad Environmental risk Biological vulnerability Biomarker

Dagnino et al (2008),
*Integr Environ Assess
 Manage*, 4(3):314-326

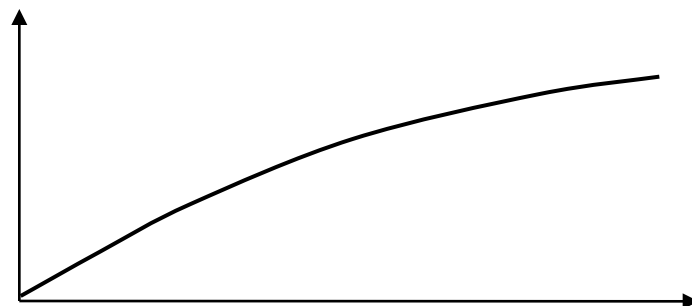
Procedura di integrazione



Stress e risposta biologica

**DECLINO
BIODIVERSITA'**

Effetti ecologici



STRESS

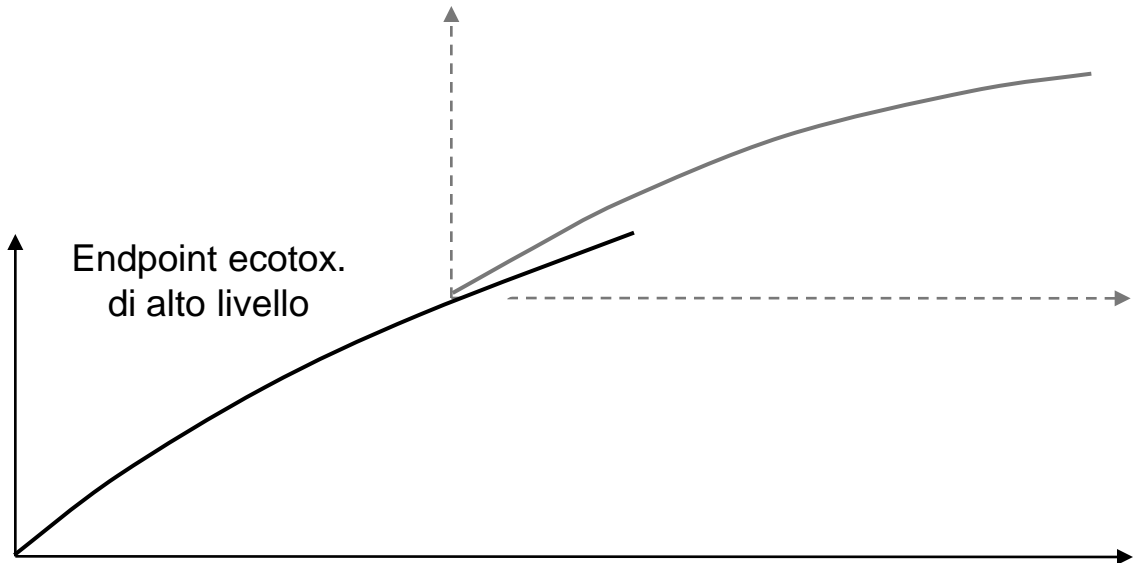
Stress e risposta biologica

**DECLINO
BIODIVERSITA'**



Effetti ecologici

**RISCHIO
BIODIVERSITA'**



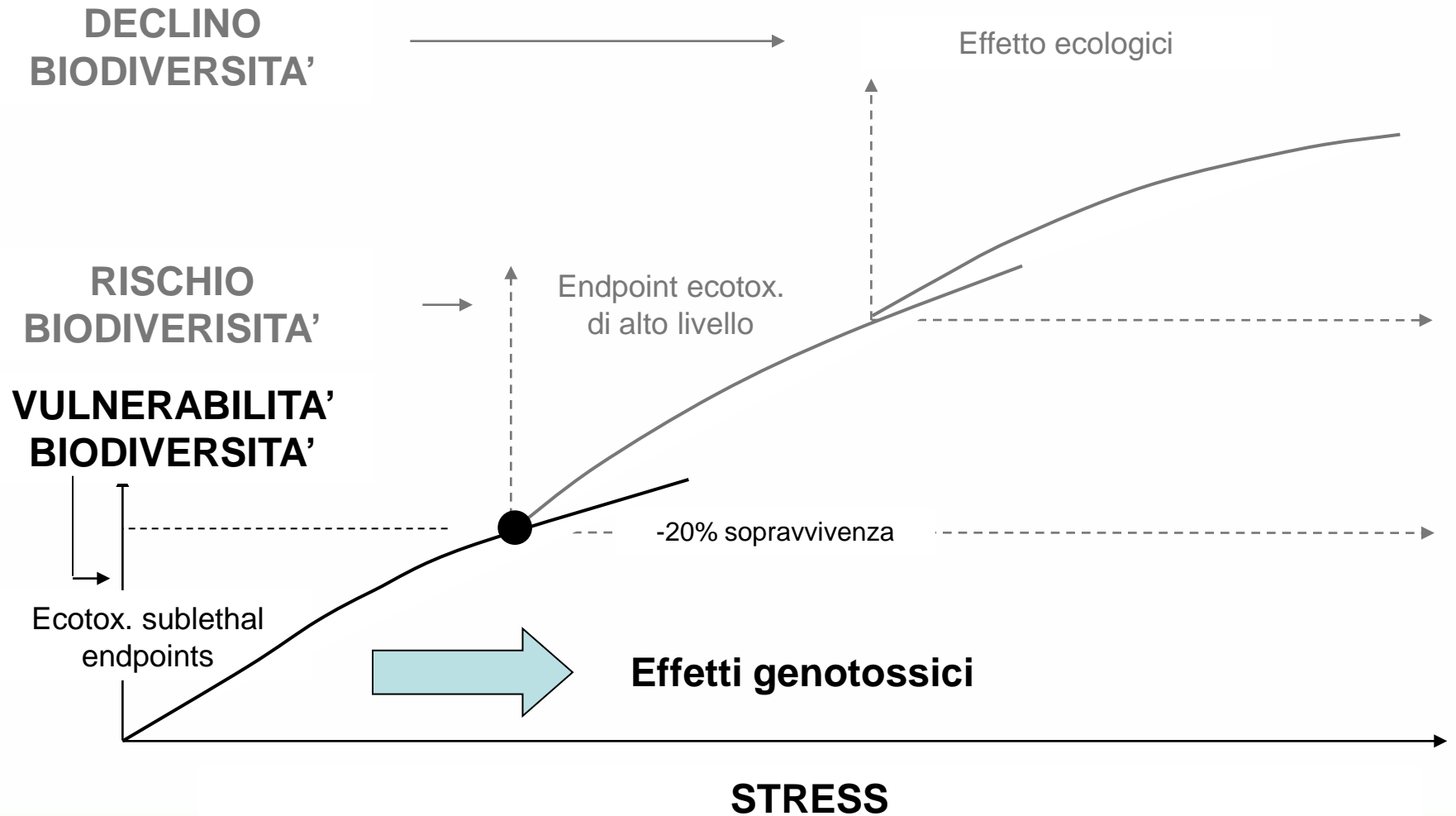
-20% sopravvivenza

Endpoint ecotox.
di alto livello

STRESS



Stress e risposta biologica





Fattori di peso

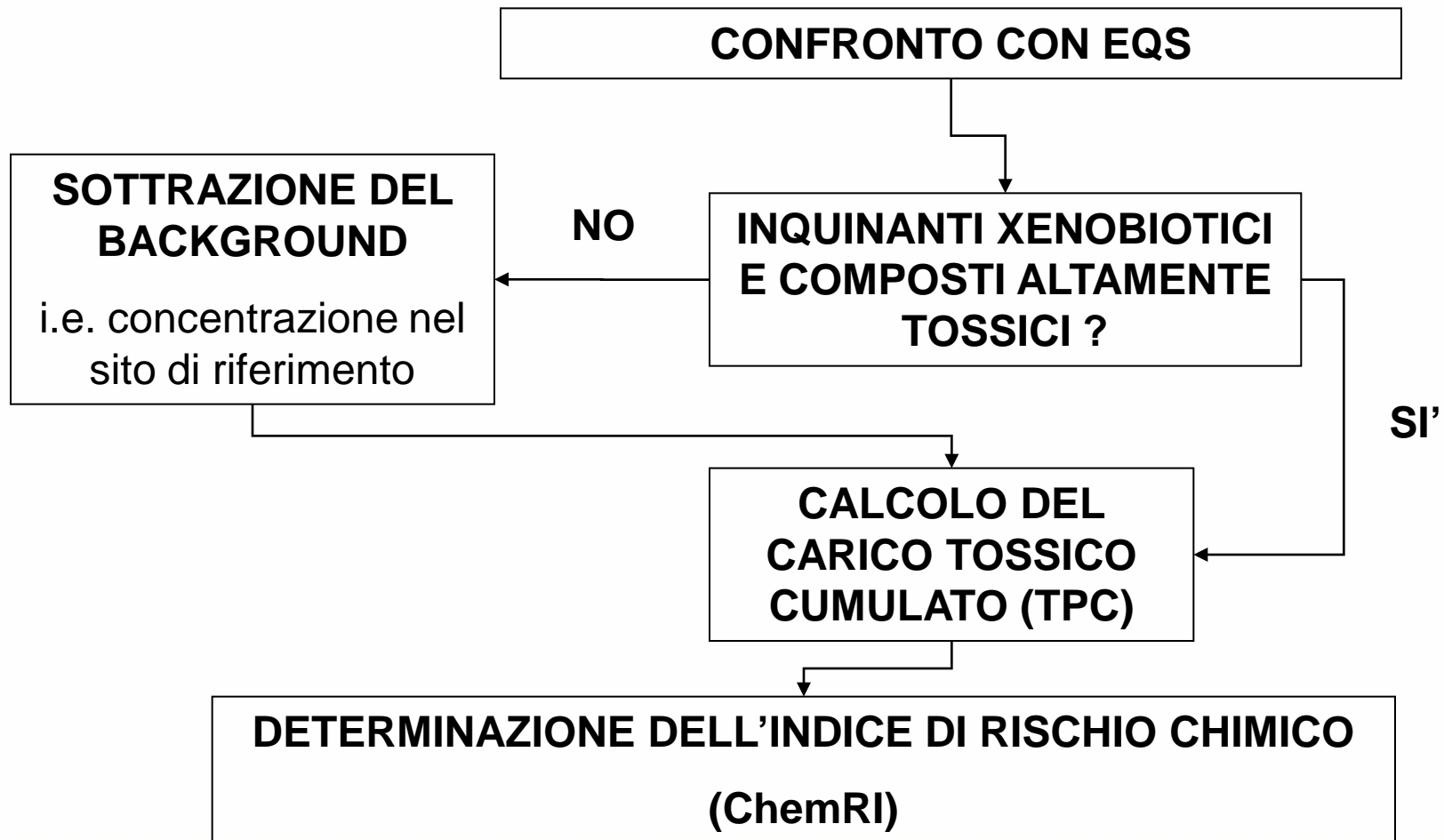
DISCIPLINE TRIAD	LoE	W.F.
CHIMICA	Biosponibilità	1.5
	Concentrazioni totali	1.0
ECOTOX.	Endpoint di alto livello	1.5
	Endpoint subletali	1.0
ECOLOGIA	Funzione e struttura comunità	2.0



Integrazione dei dati chimici

- Sottrazione dei valori di **background**
(contaminanti di derivazione non antropica)
- Rapporto con livelli di **equitossicità**
(e.g., limiti di legge, ...)
- Sommatoria dei coefficienti
(**effetto additivo**)
- Confronto con livelli soglia
- Calcolo di **ChemRI** (0-1)

Diagramma per il calcolo di ChemRI



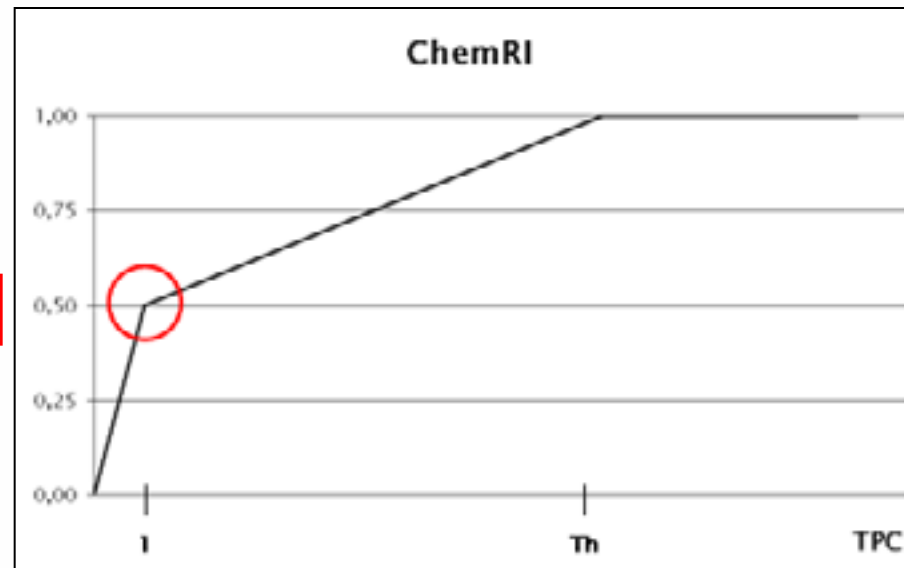
STEP	OPERAZIONE	SIGNIFICATO
Confronto con EQS	$RI = C_s / EQS$	La concentrazione rilevata nel campione (C_s) è normalizzata rispetto ad un opportuno EQS. Poiché gli EQS rappresentano livelli equitossici, questa operazione produce, per ciascun inquinante, dei livelli di tossicità normalizzati (RI)
Selezione dei composti caratteristici dell'area	I parametri chimici sono suddivisi in due categorie	I composti xenobiotici hanno generalmente origine antropica, mentre altre classi di inquinanti possono avere concentrazioni di background naturale
Sottrazione del livello di background	$RI_s - RI_{ref}$	Per gli inquinanti selezionati, I valori di RI ottenuti nel sito di riferimento sono sottratti a quello calcolato nel sito indagato
Calcolo del TPC	$TPC = \sum (RI)$	La somma dei differenti RI rappresenta il potenziale <u>effetto additivo</u> della mistura di contaminanti

If $0.0 < \text{TPC} \leq 1$ -----> $0.0 < \text{ChemRI} \leq 0.5$
by the equation: $\text{ChemRI} = 0.5 * \text{TPC}$

If $1.0 < \text{TPC} \leq \text{Th}$ -----> $0.5 < \text{ChemRI} \leq 1.0$
by the equation: $\text{ChemRI} = (0.5 + 0.5 * (\text{TPC} - 1.0) / (\text{Th} - 1.0))$

If $\text{TPC} > \text{Th}$ -----> then $\text{ChemRI} = 1.0$

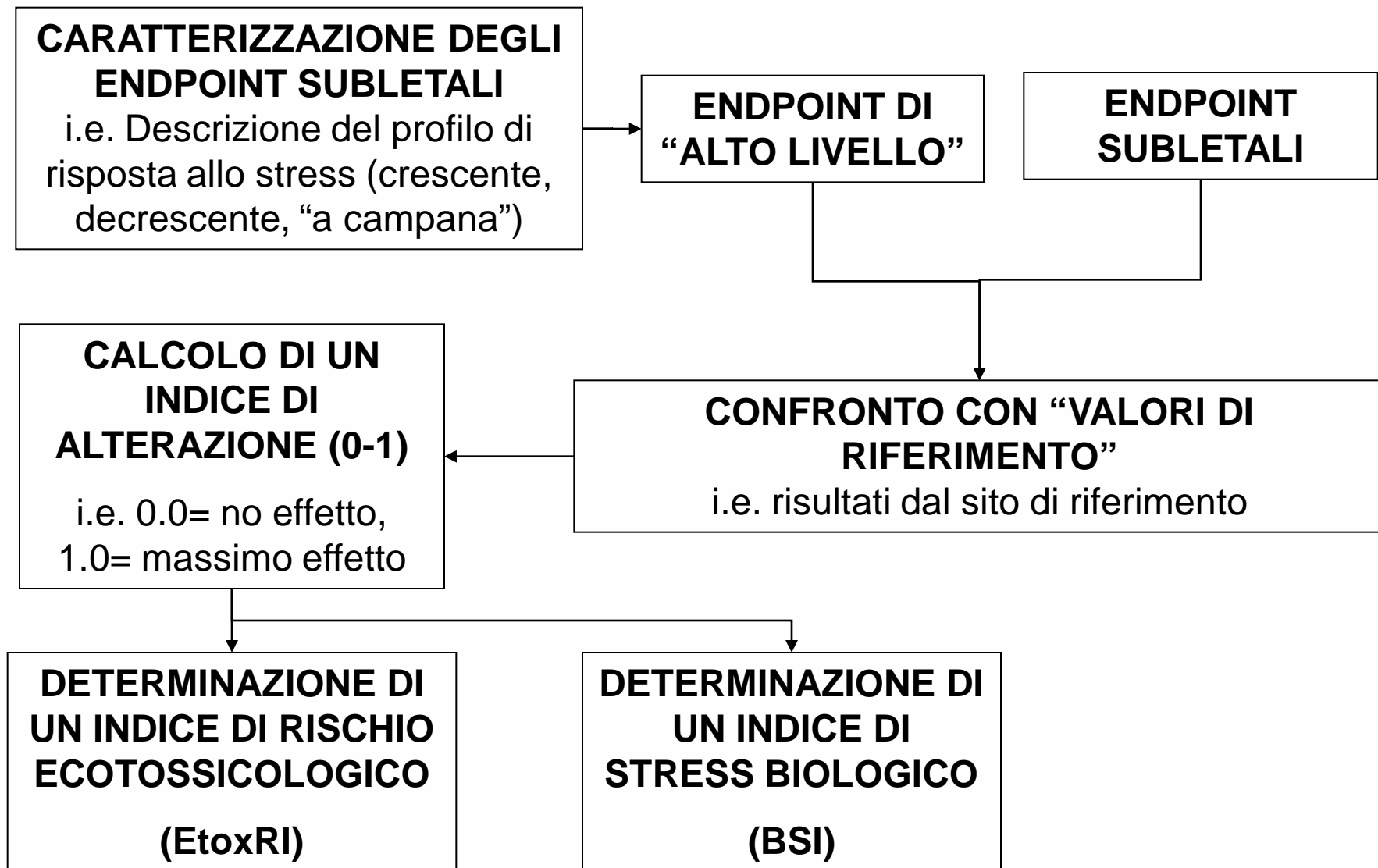
Livello EQS





Integrazione dei dati biologici

- Variazione rispetto al **sito di riferimento**
- Confronto con **valori soglia**
- Calcolo di **EcoRI**
(effetti a livello di **popolazione-comunità**)
- Calcolo di **EtoxRI**
(effetti ecotossicologici di **alto livello**)
- Calcolo di **BSI**
(effetti ecotossicologici **subletali**)



ENDPOINT ECOTOSSICOLOGICI

If $X \leq 0.80$ à $0.00 < AI \leq 1.00$

Equazione: $AI = X/0.8$

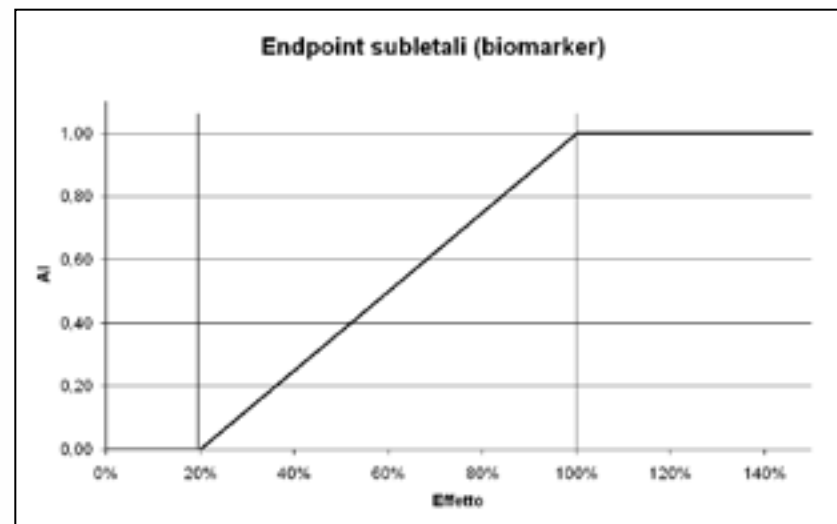
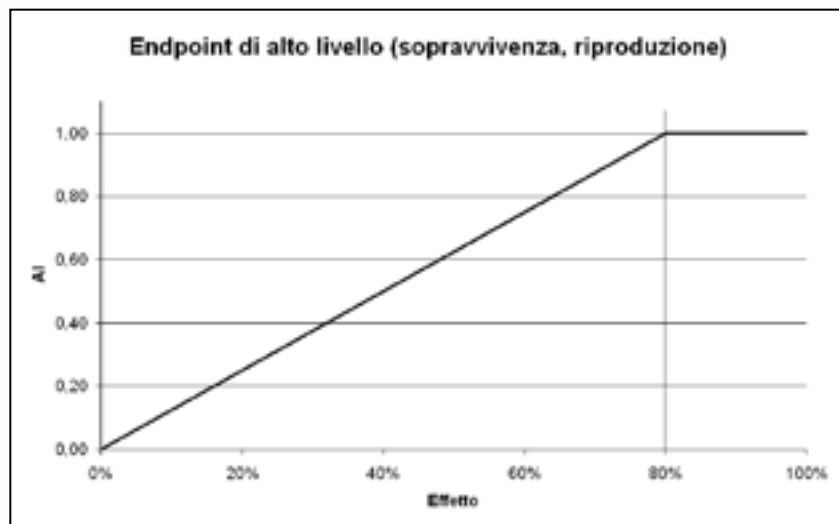
If $X > 0.80$ à $AI = 1.0$

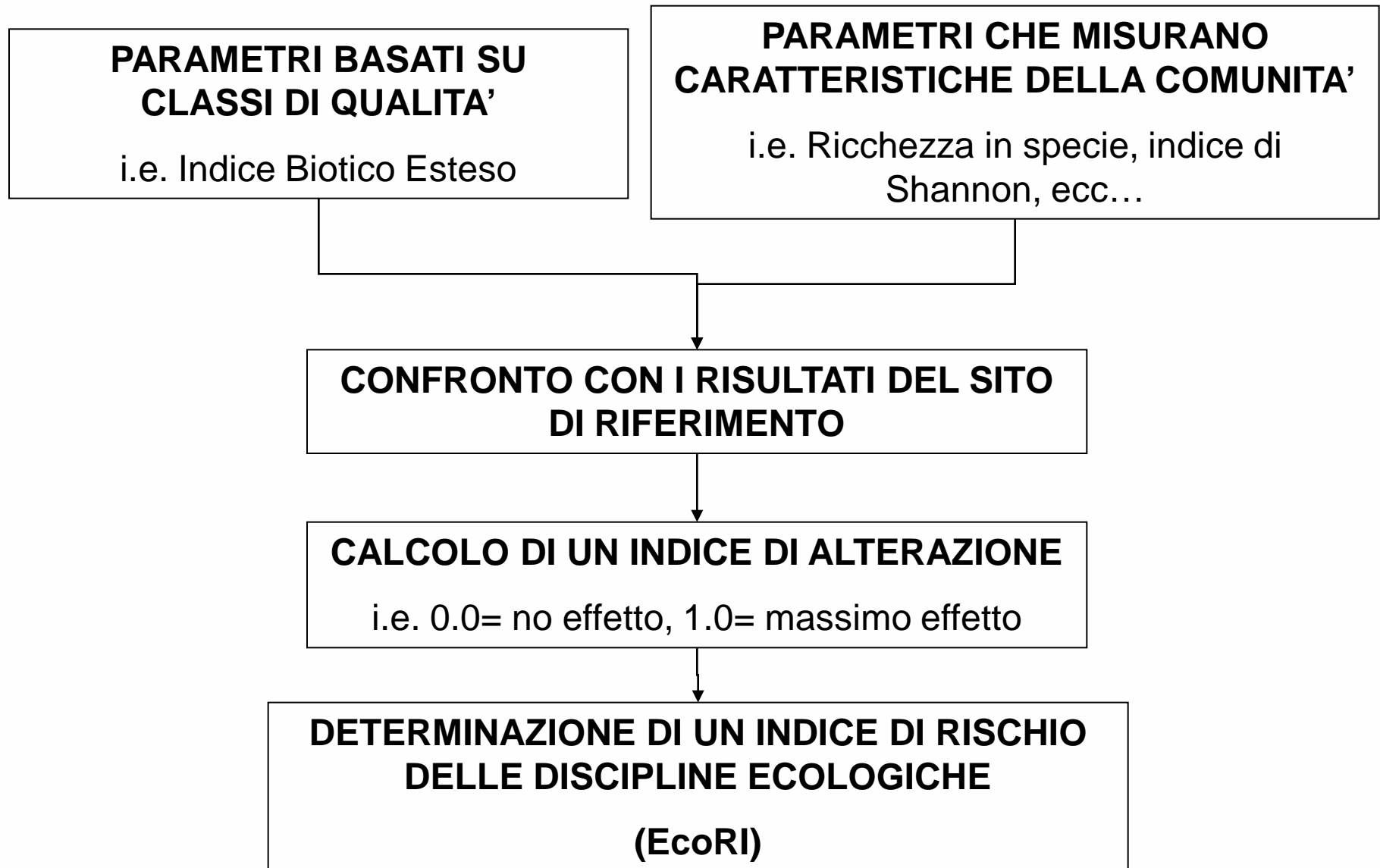
If $X \leq 0.20$ à $AI = 0.0$

If $0.20 < X \leq 1.00$ à $0.00 < AI \leq 1.00$

Equazione: $AI = (X-0.20)/0.8$

If $X > 1.00$ à $AI = 1.0$





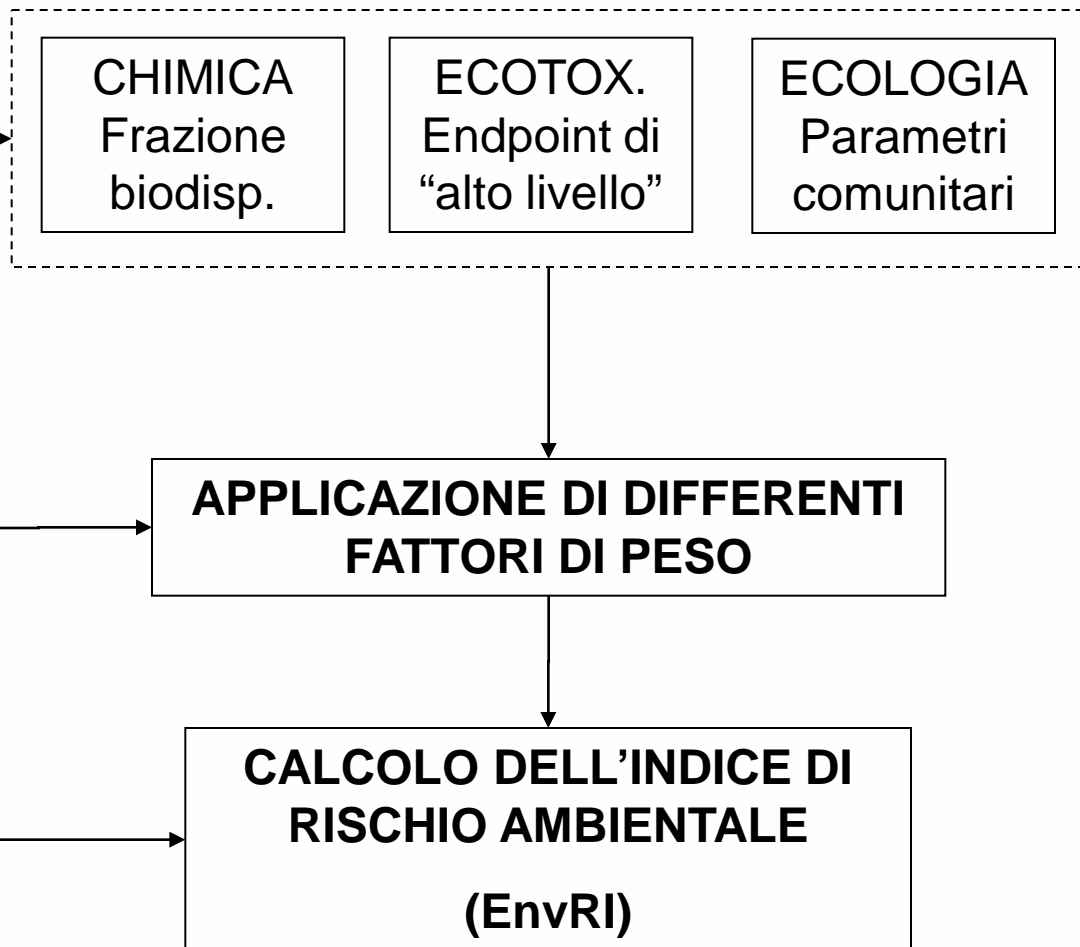
Calcolo dell'indice EnvRI

Indici di rischio calcolati per ogni disciplina Triad

In caso non siano disponibili dati di biodisponibilità, sono utilizzate le concentrazioni chimiche totali

Considerando la rilevanza di ciascuna disciplina Triad I differenti indici di rischio vengono integrati

EnvRI rappresenta la media pesata degli indici delle singole discipline Triad

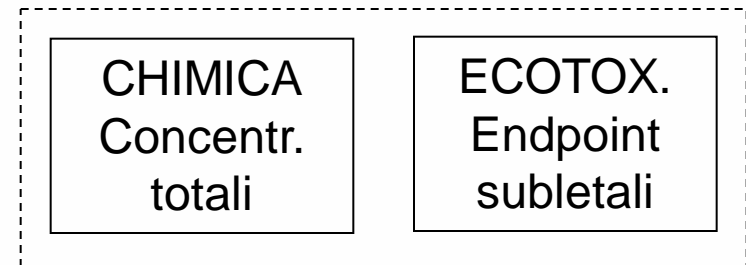


Interpretazione dei risultati

Deviazione (D)	EnvRI	Destinazione d'uso	
		Accettabile	Non accettabile
D < 0.4	0.00 < EnvRI < 0.25	N, A, R, I	
	0.25 < EnvRI < 0.50	A, R, I	N, A (with targets of concern)
	0.50 < EnvRI < 0.75	I, (R)	N, A, R (with "green" functions)
	0.75 < EnvRI < 1.00	I	N, A, R, I (with "green" functions)
D > 0.4 approfondimento oppure...	0.00 < EnvRI < 0.25	A, R, I	N, A (with targets of concern)
	0.25 < EnvRI < 0.50	I, (R)	N, A, R (with "green" functions)
	0.50 < EnvRI < 1.00	I	N, A, R, I (with "green" functions)

Calcolo dell'indice di Vulnerabilità biologica (BVI)

Indici di rischio calcolati considerando le concentrazioni totali di inquinanti (ChemRI) e gli endpoint ecotossicologici subletali (BSI)

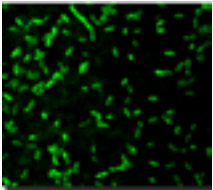


BVI rappresenta la media dei due indici



Studio degli effetti biologici

- Test ecotossicologici



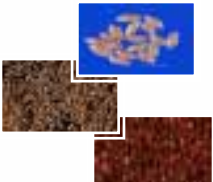
Test Microtox® (*Vibrio fischeri*)

Endpoint di “alto livello”: inibizione della bioluminescenza



Test con alghe (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

Endpoint di “alto livello”: tasso di crescita algale



Fitotest (semi monocotiledoni/dicotiledoni)

Endpoint di “alto livello”: tasso di germinazione, allungamento degli apici radicali

Endpoint subletali: danno genotossico

Studio degli effetti biologici

- Test ecotossicologici

Test con protozoi (*Dictyostelium discoideum*)



Endpoint di “alto livello”: tasso di sopravvivenza, tasso di replicazione
Endpoint subletali: stabilità delle membrane lisosomiali, tasso di endocitosi, danno genotossico

Analisi genomica (microarray, Q-PCR quantitativa)

Analisi proteomica

Analisi metabolomica



Test con nematodi (*Caenorhabditis elegans*)

Endpoint di “alto livello”: tasso di sopravvivenza

Analisi genomica (microarray, Q-PCR quantitativa)

Studio degli effetti biologici

- Test ecotossicologici



Test con crostacei (*Daphnia magna*)

Endpoint di “alto livello”: inibizione della motilità



Test con ostracodi (*Heterocypris incongruens*)

Endpoint di “alto livello”: tasso di sopravvivenza

Endpoint subletali: tasso di crescita

Studio degli effetti biologici

- Test ecotossicologici

Test con bivalvi (*Unio pictorum*)



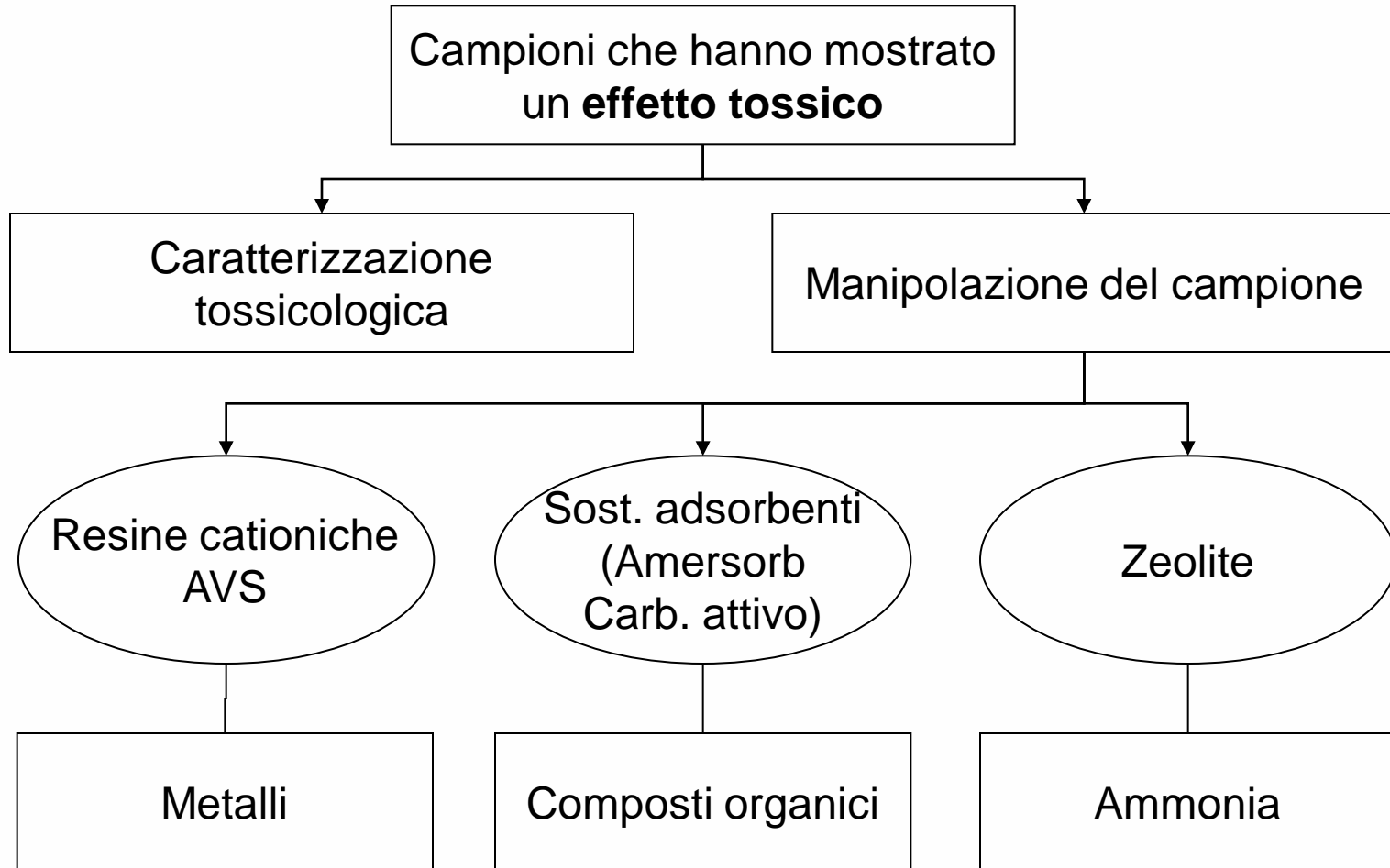
Endpoint di “alto livello”: tasso di sopravvivenza, stress su stress
Endpoint subletali: stabilità delle membrane lisosomiali, stress ossidativo, danno genotossico, biomarker di esposizione



Test con pesci (*Danio rerio*)

Endpoint di “alto livello”: sviluppo embrionale

Identificazione dei composti tossici



Studio degli effetti biologici

- Test a livello di comunità



Macroinvertebrati bentonici

Indice Biotico Esteso



Comunità di diatomee

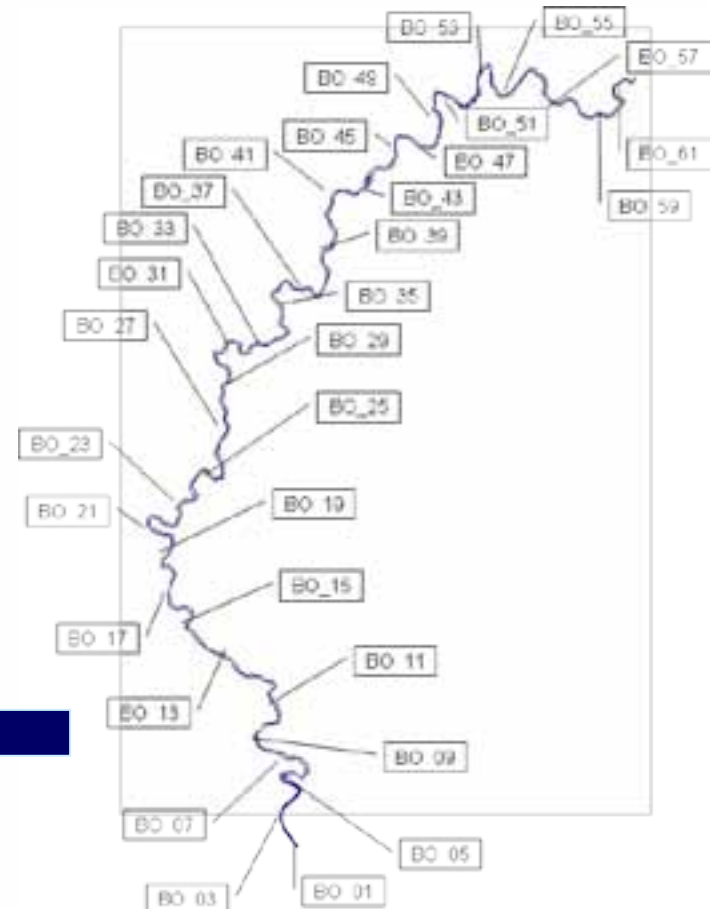
EPI-D



Comunità microbica

Biomassa batterica, DGGE

Caso studio – Fiume Bormida

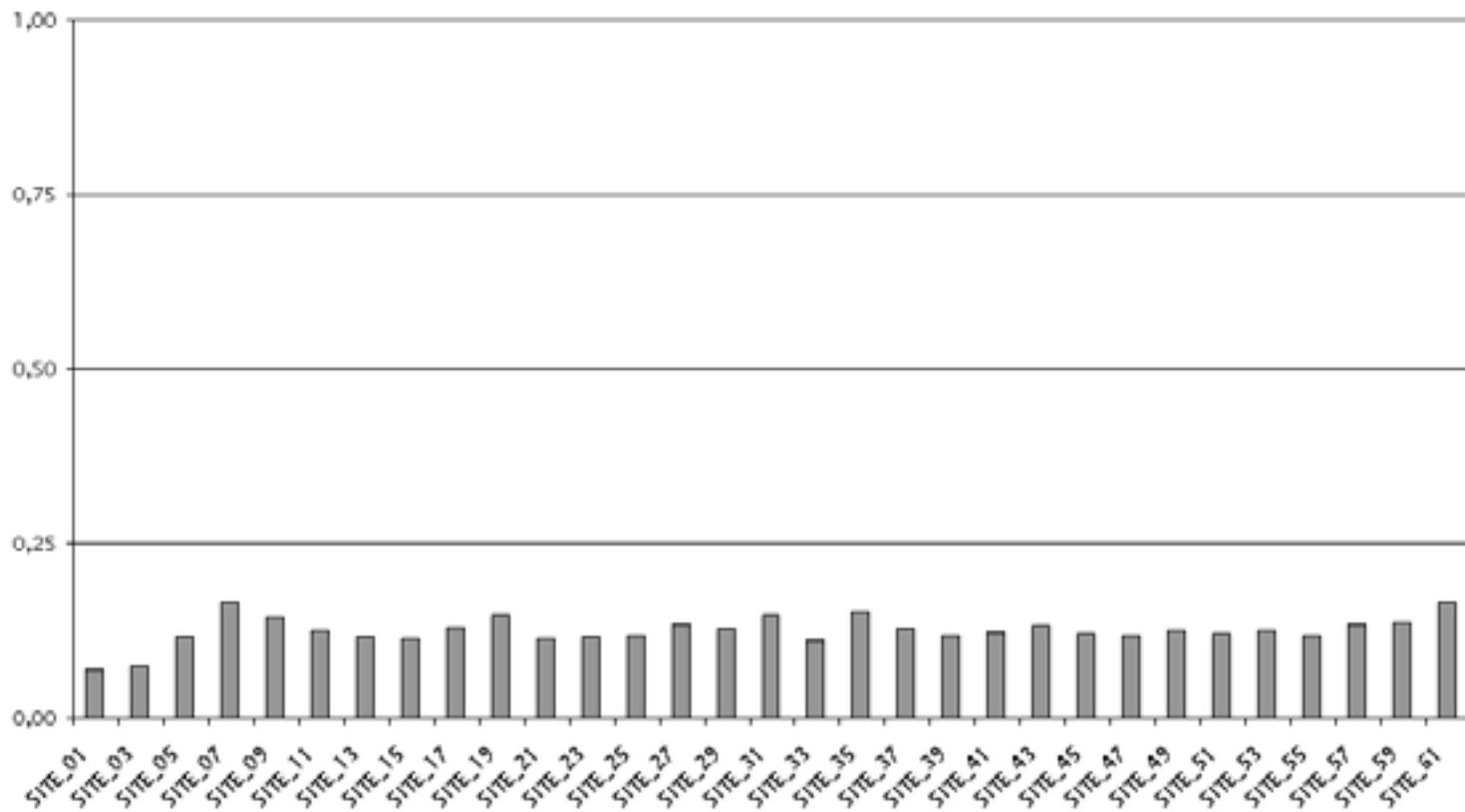


Data set

CHIMICA	Biodisponibilità	N.D.
	Concentrazioni totali	Metalli pesanti, IPA, PCB, ecc...
ECOTOX.	Endpoint di alto livello	Batteria di saggi tossicologici (crostacei, nematodi, vegetali, protozoi e batteri) su sedimento e acqua interst.
	Endpoint subletali	Biomarker su protozoi e vegetali Biomarker di genotossicità su sedimento e acqua interstiz.
ECOLOGIA	Struttura e funzione delle comunità	Studio comunità bentoniche (IBE)

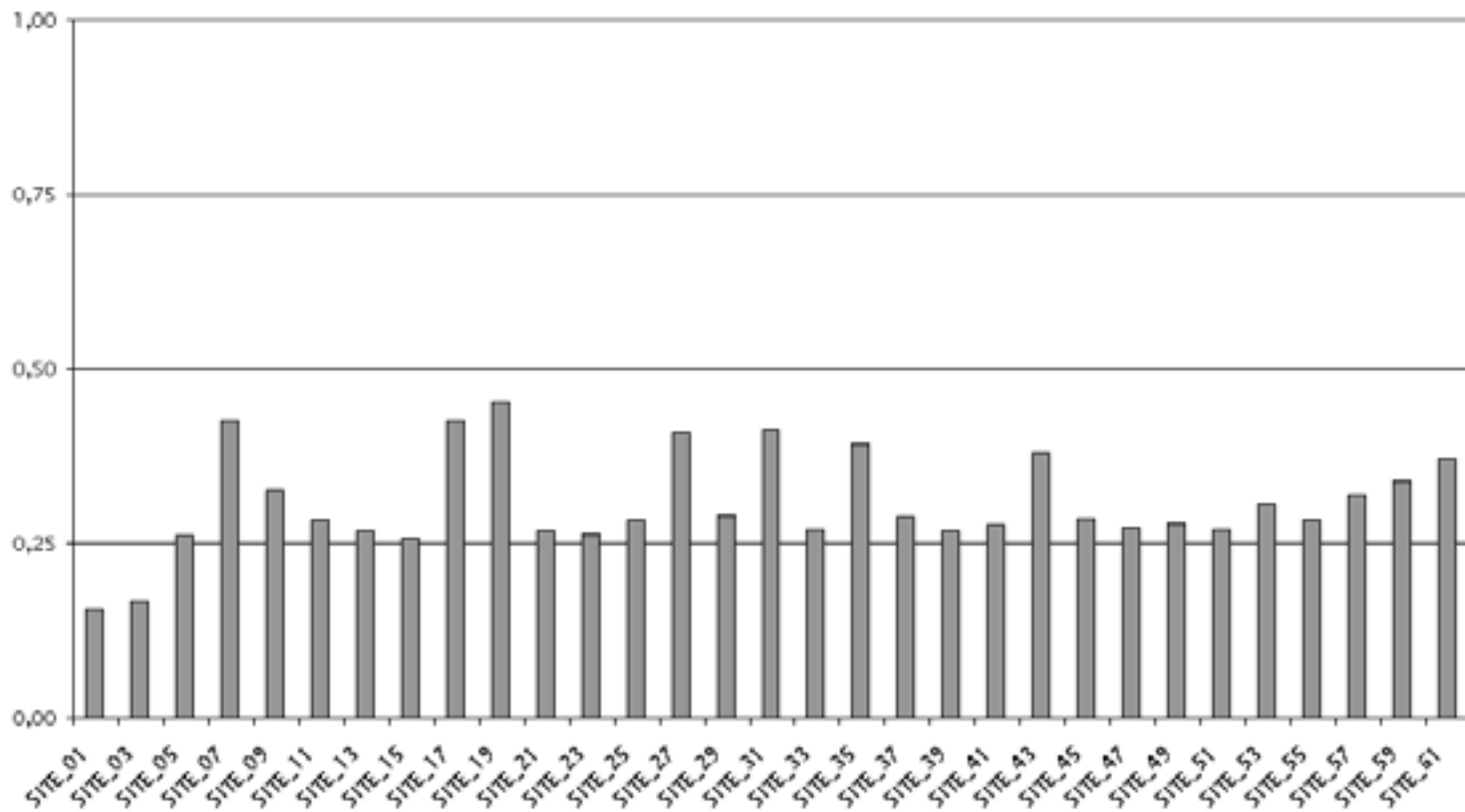
Risultati: Indice di rischio ecologico

EnvRI



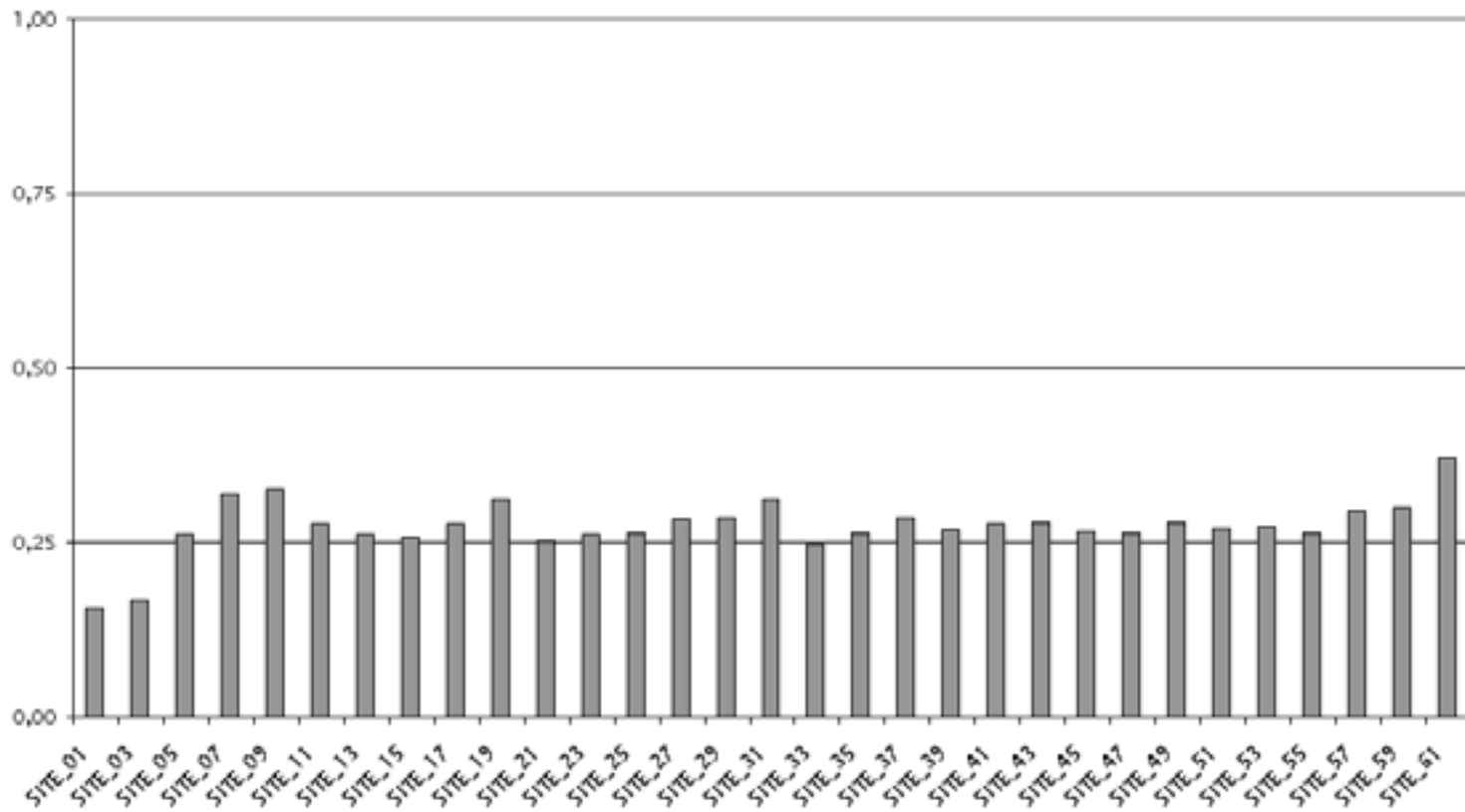
Risultati: Indice di vulnerabilità biologica

BVI



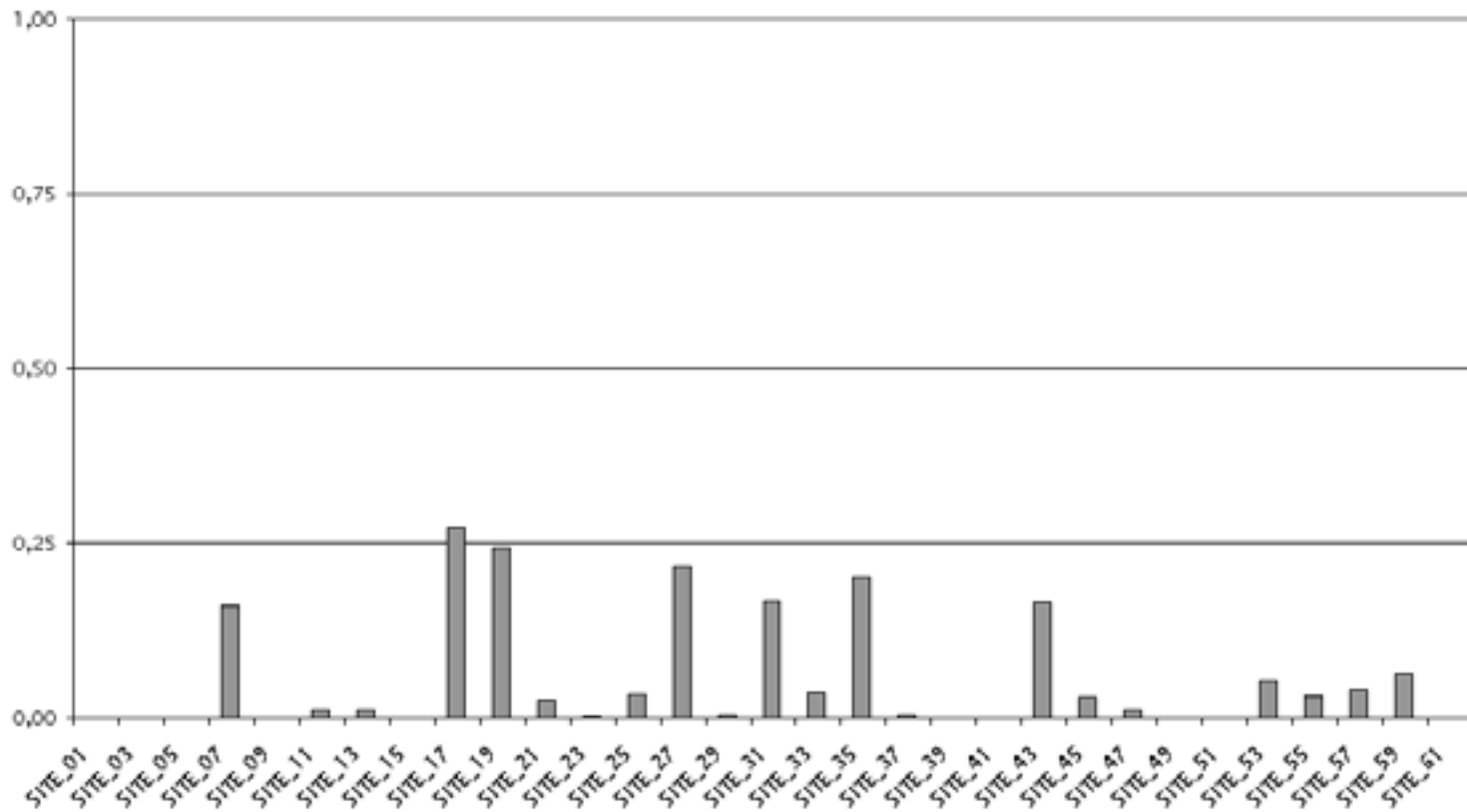
Risultati: Deviazione

D



Risultati: Indice di genotossicità

GTI



Conclusioni

- Il Sistema presentato permette di integrare in modo oggettivo dati estremamente eterogenei
- L'output differenziato permette di evidenziare eventuali situazioni che rappresentano un rischio potenziale per l'ambiente
- Considerare la variabilità nei singoli parametri permette di valutare la probabilità di rischio

Molecular Highthroughput Techniques and The Systems Toxicology Approach

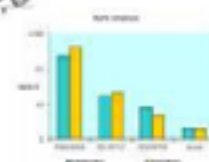
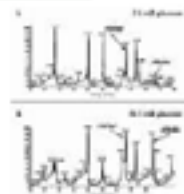
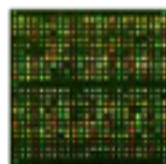
i.e. an integration of

Transcriptomics

Proteomics

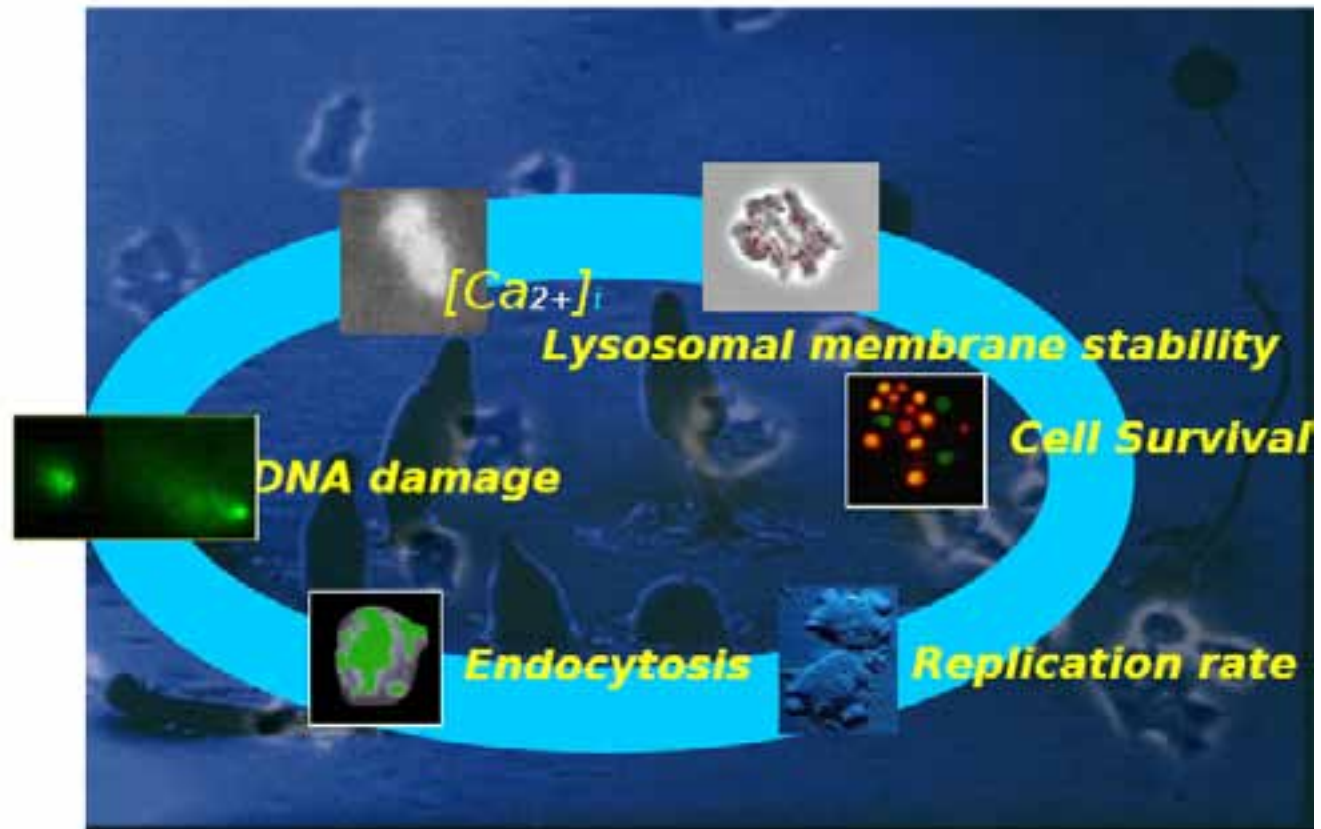
Metabolomics

biochemical / cytochemical /
functional data (physiomics)

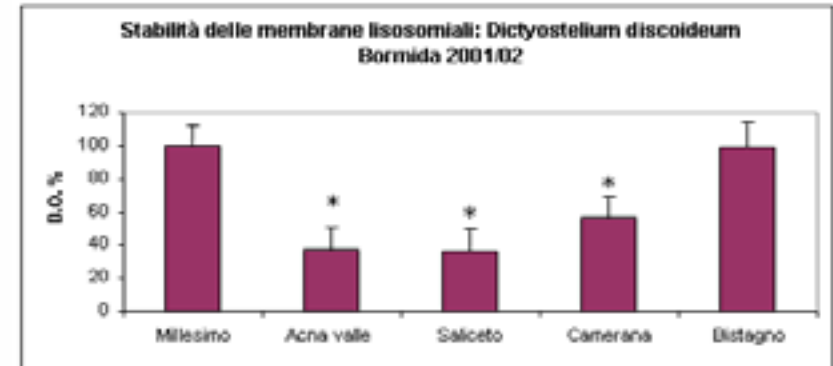
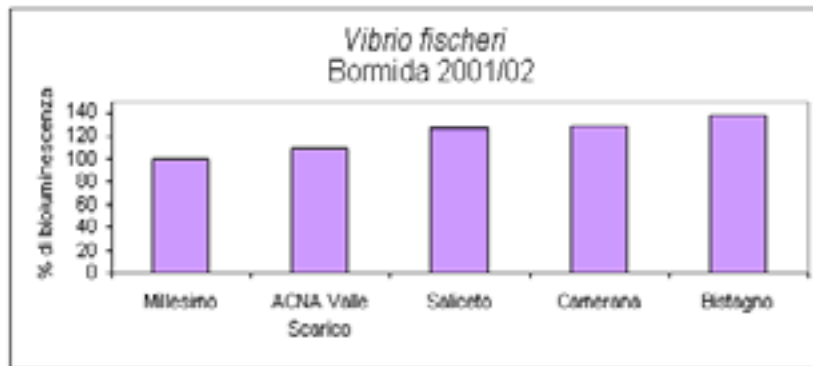
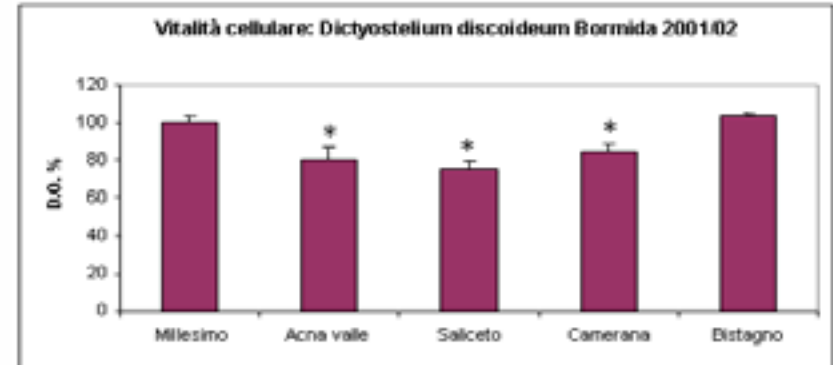
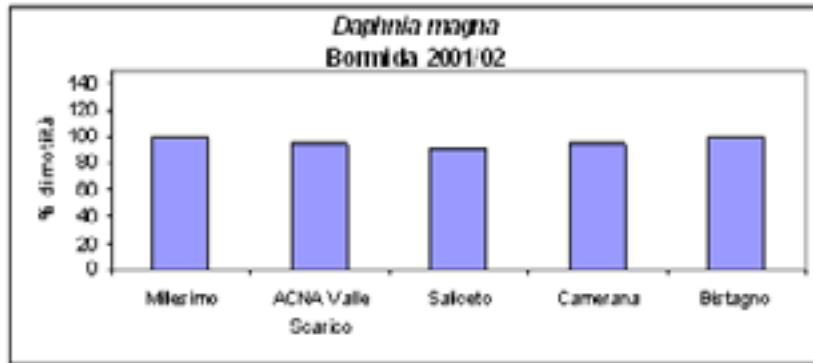


To explain mechanistic effects of pollutants in
ecotoxicological relevant species

The social amoeba *Dictyostelium discoideum* as a model species in ecotoxicology



Dondero et al., *Comp. Biochem. Physiol.*, 2006.



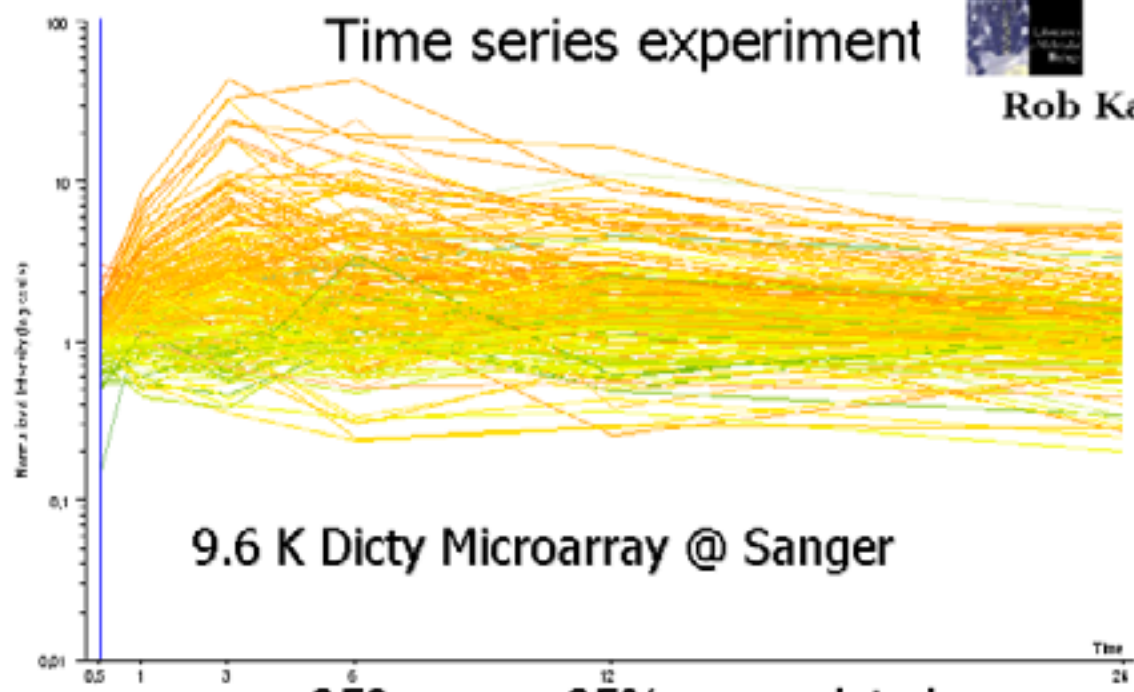
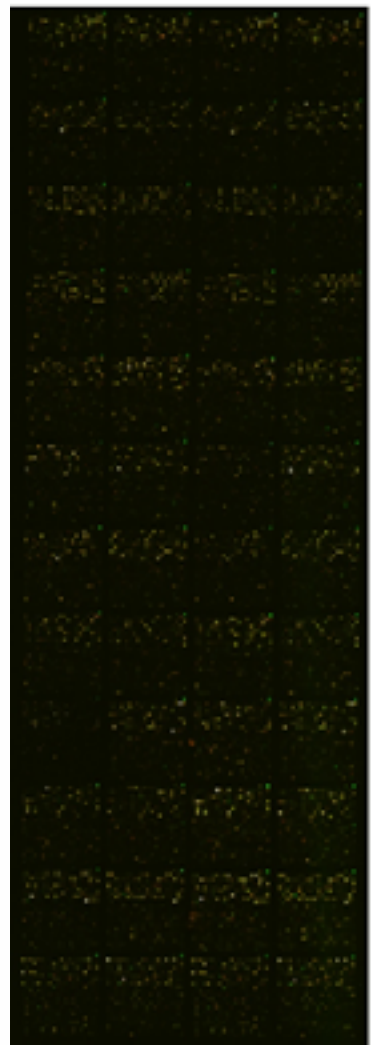
What's before mortality? Transcriptomic changes



Al Ivens
Gareth Bloomfield
Jason Skelton

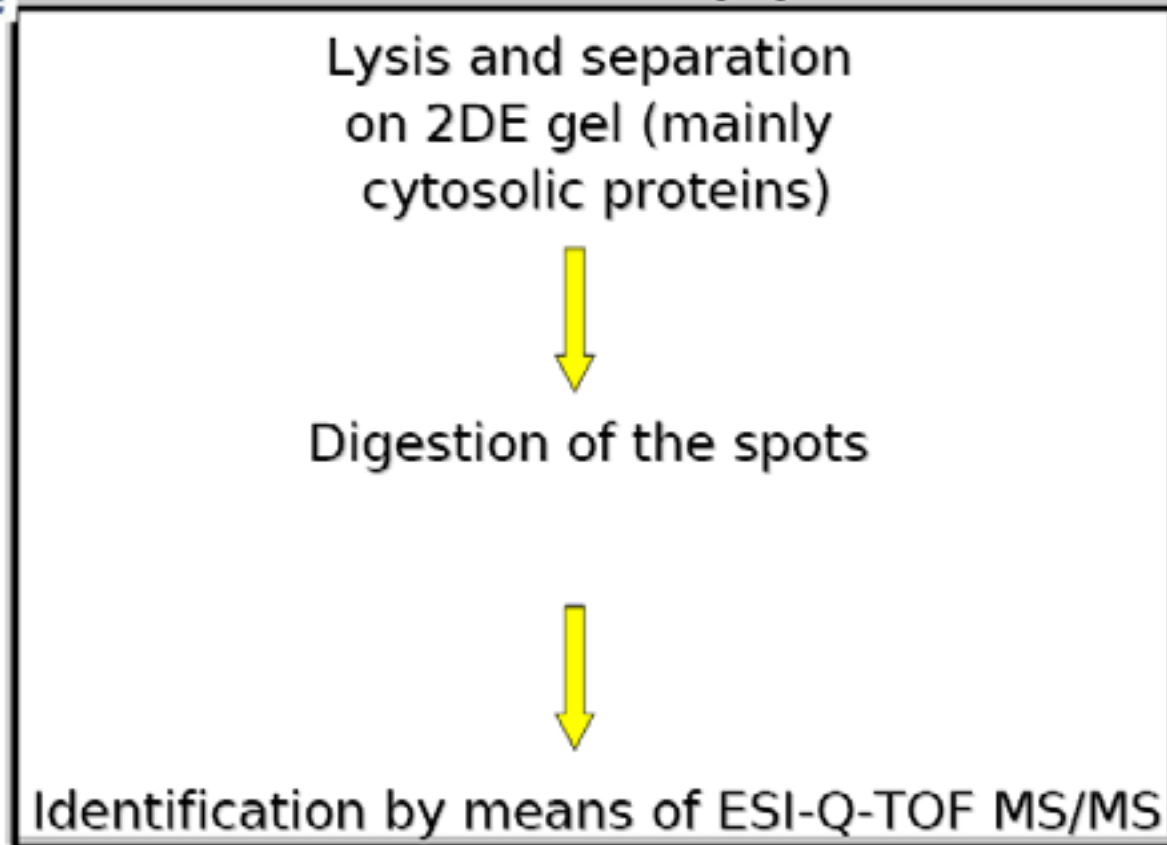


Rob Kay





Proteomics approach



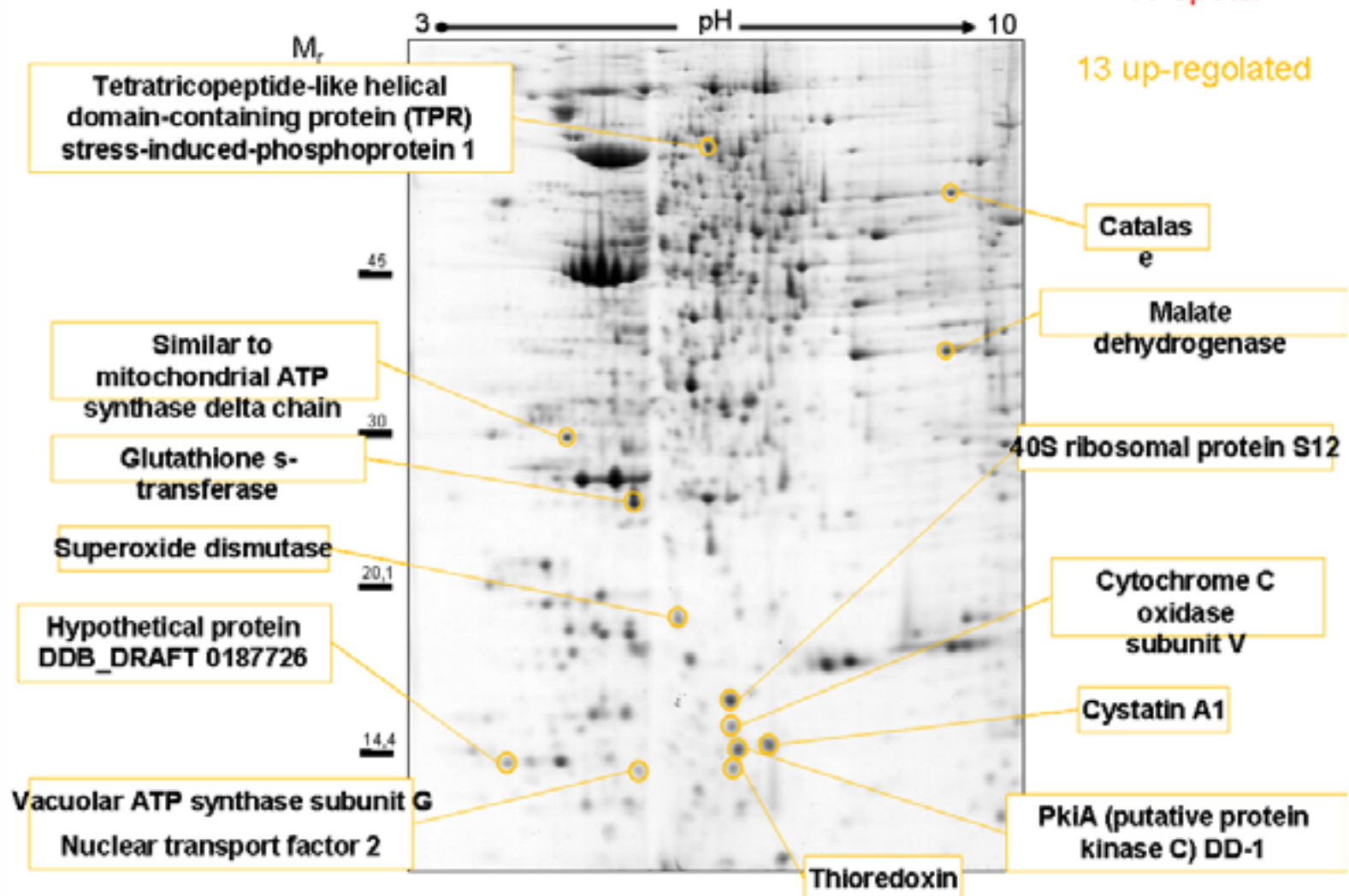
300 proteins were identified



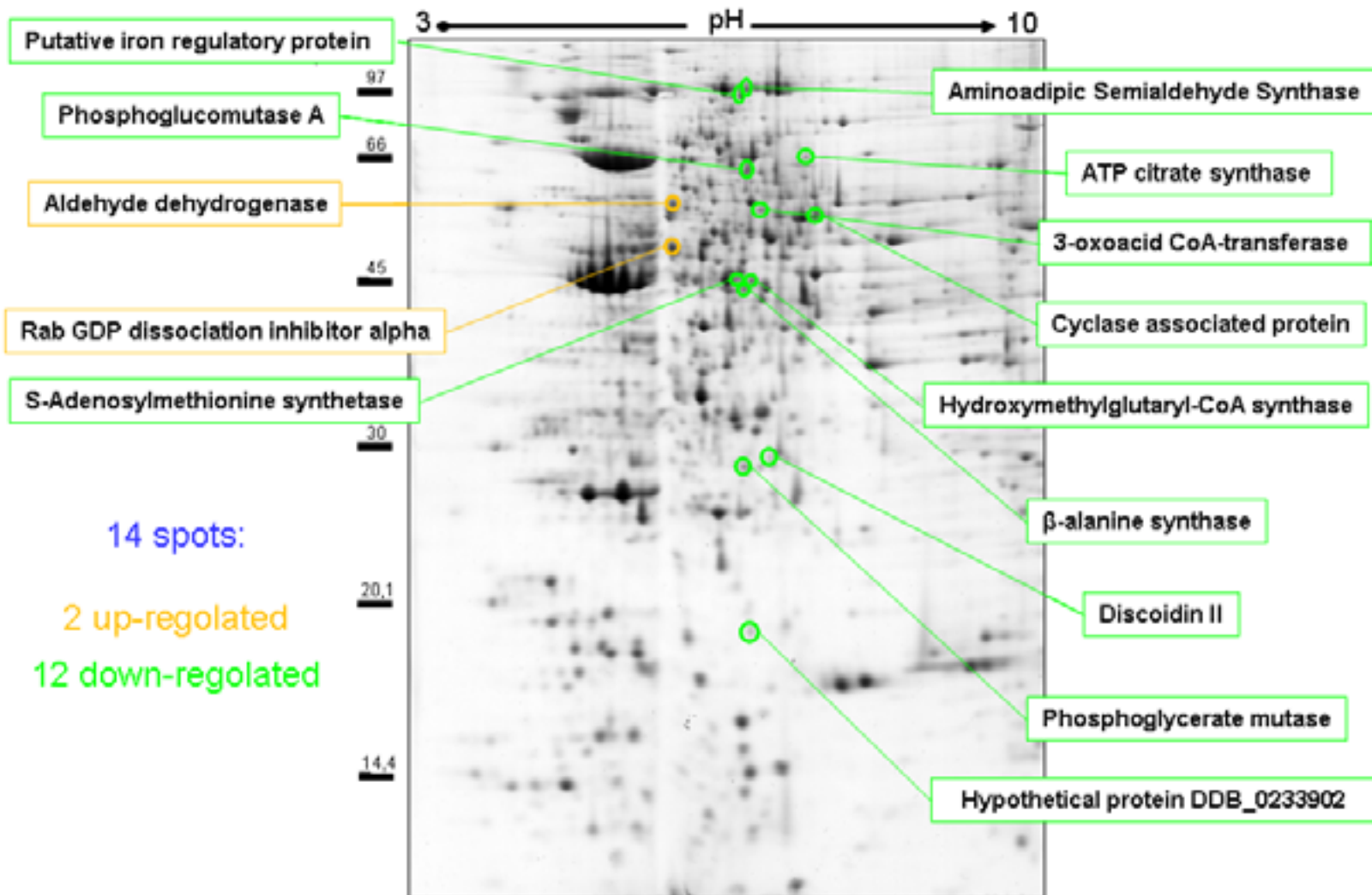
Dictyostelium discoideum – Hg 2 μ M

13 spots:

13 up-regulated

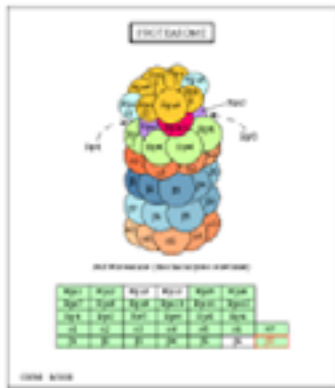


Dictyostelium discoideum – Hg 10 μ M

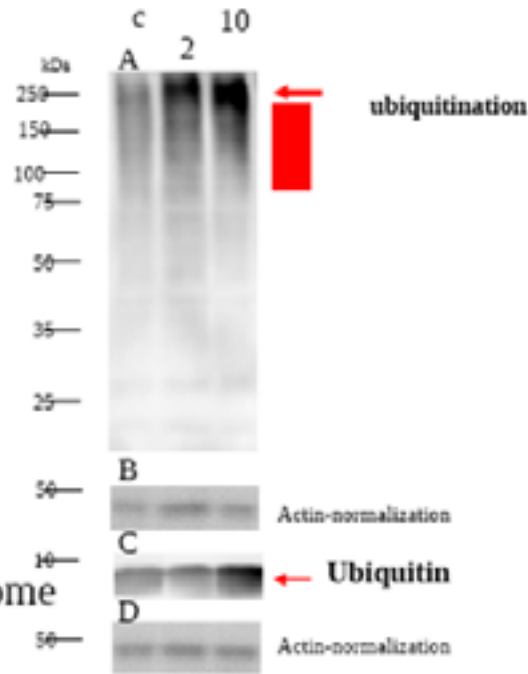




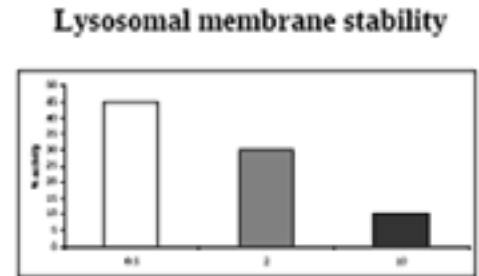
Increased catabolic processes



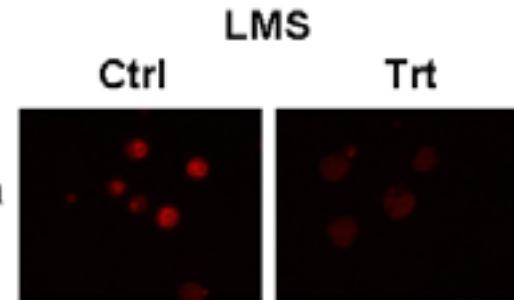
Almost all genes belonging to the proteasome complex were overexpressed at 10 μ M Hg



Molecular: protein expression



Increase of autophagy



Protein Carbonyl Assay - immunoblotting method (2-DE)



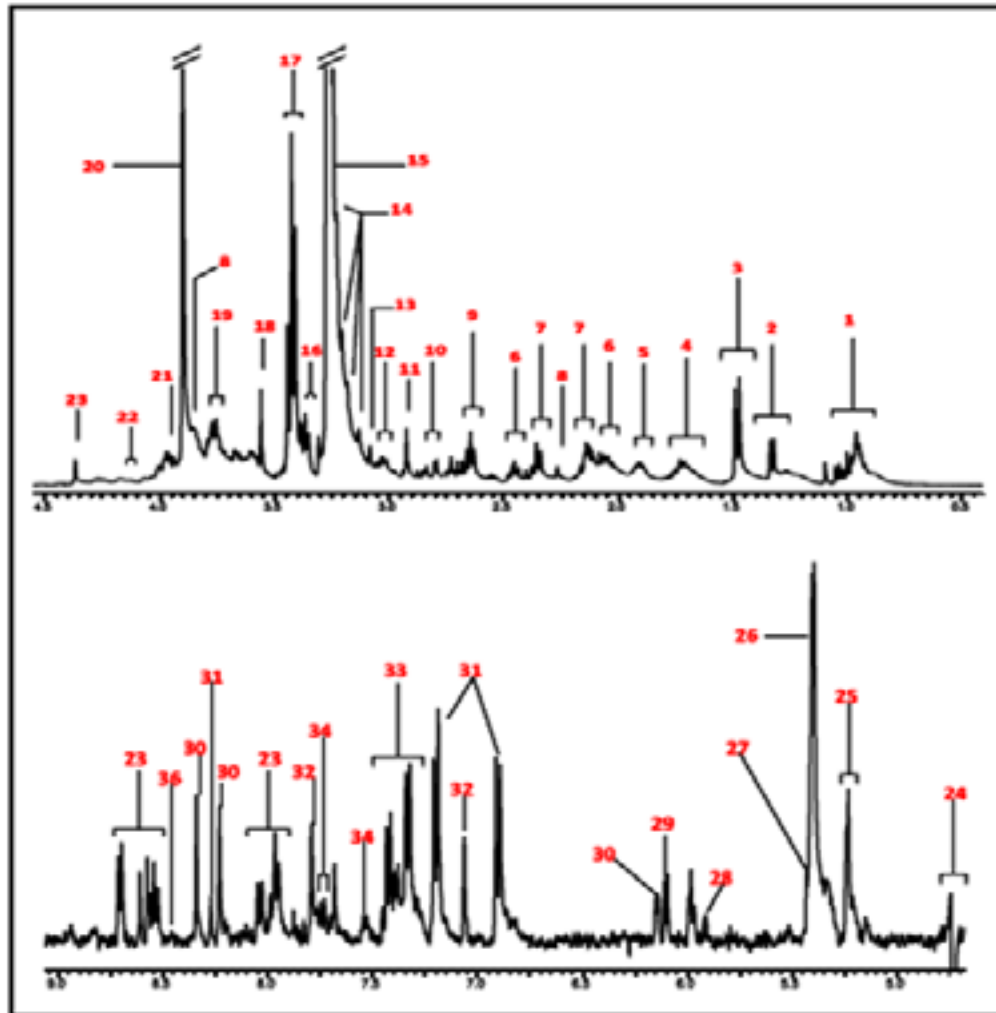
Control

Treated

6 replicates

Spot No	Protein ID	gi
1	Rho GDP-dissociation inhibitor	gi 66803106
2	heat-shock cognate protein 70, Hsc70	gi 2564920
3	citrate synthase, mitochondrial	gi 60471982
4	glucose/ribitol dehydrogenase family protein	gi 66801147
5	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	gi 66825831
6	S-adenosylmethionine synthetase	gi 66803080
7	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	gi 66823857
8	cystathionine beta-synthase	gi 66828293
8	6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	gi 66816225
9	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 66820500
10	zinc-containing alcohol dehydrogenase (ADH)	gi 66822445
11	/	/
12	Putative sulfide quinone reductase	gi 66801601
13	elongation factor 1 alpha	gi 7275
14	Vacuolar ATP synthase subunit E (EC 3.6.1.34) (V-ATPase E subunit)	gi 28850403

NMR spectra





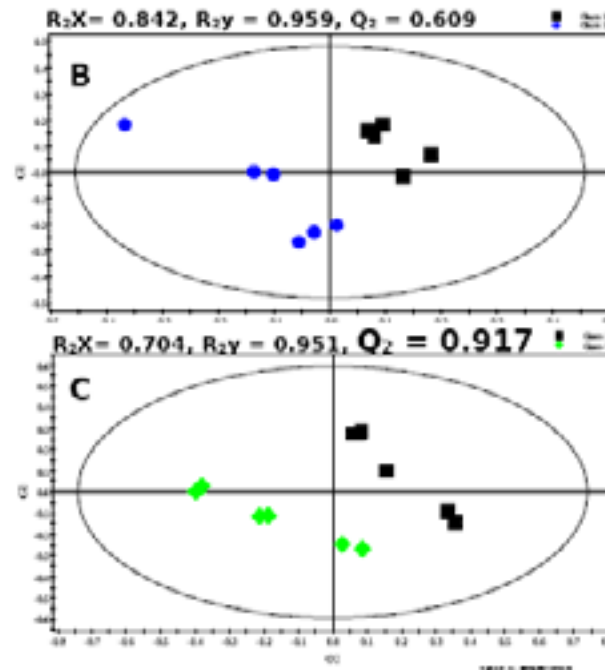
Metabolomics



Jules Griffin

Oliver Jones

Distinct patterns have been evidenced

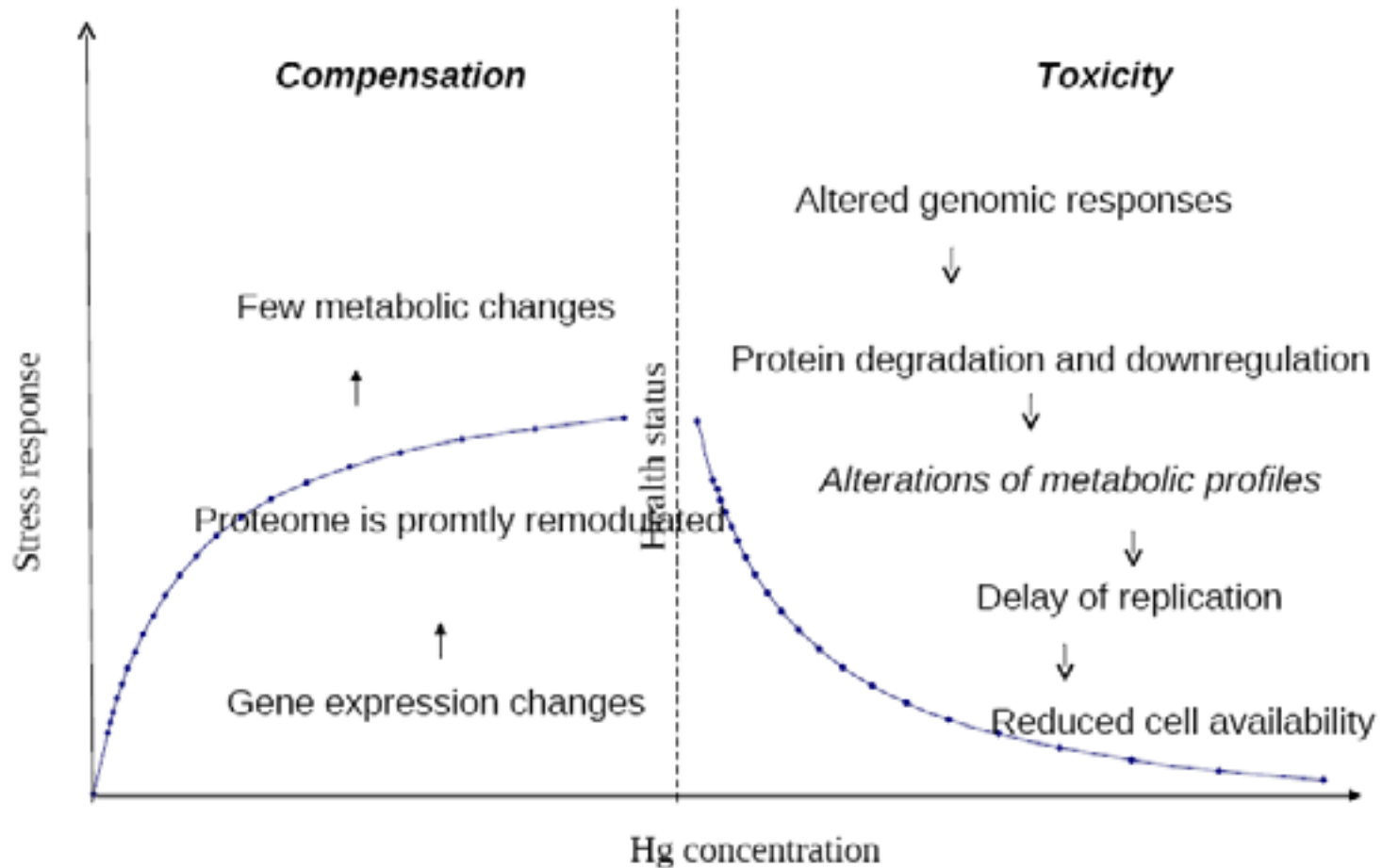


Driving metabolite:
increased levels of
reduced GSH

Driving metabolites:
drop of many
amino acids (serine/
glycine; valine,
leucine, asparagine)



The systems toxicology approach suggested:



**Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”
Dipartimento di Scienze dell’Ambiente e della Vita
Società Chimica Italiana
Divisione di Chimica dell’Ambiente e dei Beni Culturali
SETAC Italian Branch**



5^a SCUOLA NAZIONALE RESIDENZIALE SITI CONTAMINATI

**Monitoraggio e bonifica dei siti
contaminati.**

**Riduciamo l’inquinamento
ambientale: Applichiamo il
REACH**

Alessandria, 29.06.2009 – 01.07.2009

**Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”
Facoltà di Scienze M.F.N.
Dipartimento di Scienze dell’Ambiente e della Vita**



**PERCORSO DI ALTA
FORMAZIONE
NEL SETTORE DEL
MONITORAGGIO
E DELLA
VALUTAZIONE DEL
RISCHIO AMBIENTALE**



CONCLUSO	Sistemi di biomonitoraggio mediante organismi sentinella (5 crediti)
CONCLUSO	Analisi del rischio ecologico e della vulnerabilità della biodiversità (I) (5 crediti)
CONCLUSO	Analisi del rischio sanitario (5 crediti)
CONCLUSO	Genomica ambientale (5 crediti)
Settembre Ottobre 2009	Analisi del rischio ecologico e della vulnerabilità della biodiversità (II) (5 crediti) Corso pratico relativo ai test ecotossicologici ed ecologici applicati nella valutazione del rischio ecologico di suoli, acque e sedimenti fluviali ed utilizzazione di sistema esperto di supporto decisionale
Settembre Ottobre 2009	Valutazione della biodisponibilità degli inquinanti (5 crediti)

<http://www.disav.unipmn.it/Percorso-d/index.htm>

viarengo@unipmn.it