

IIIª Giornata di Ecotossicologia Applicata
Metodi ecotossicologici:
verso criteri di valutazione comuni per ambiti diversi
22-23 Novembre 2023

ISPRA – Via del Cedro 38 - 57122 Livorno

BREVE RESOCONTO

A cura degli organizzatori

Interventi di apertura

Si conferma l'immissione e il ritrovamento nell'ambiente, in particolare nelle acque, di contaminanti emergenti e loro metaboliti per i quali non sempre sono noti gli effetti sul biota, anche oltre la determinazione delle rispettive concentrazioni effettive delle singole sostanze, ed in relazione al progressivo cambiamento climatico. Da qui una ulteriore conferma della validità dell'approccio ecotossicologico (saggi biologici, biomarkers, studi sul bioaccumulo...), per valutare gli effetti e lo stato di salute del biota, condizione preliminare per una valutazione anche dei rischi per la salute umana.

Riguardo la novità dei risultati del Questionario a suo tempo distribuito, possiamo sintetizzare che è stato un primo approfondimento dell'evoluzione avvenuta nell'ultimo decennio, sia in termini di acquisizione delle competenze che in termini di ritorno economico per laboratori pubblici e privati. Hanno risposto poco più del 10% di tutti i laboratori in attività, anche se molti dei principali. L'obiettivo per il prossimo futuro è quello di raddoppiare il numero dei partecipanti, a partire dal coinvolgimento di tutte le agenzie regionali ambientali (tramite SNPA) e da un numero maggiore di laboratori di Università e centri di ricerca, nonché di strutture private, proseguendo la collaborazione con la società di consulenza 3T-Hub, così da portare al prossimo convegno a fine novembre 2024 risultati aggiornati.

Sessioni

Il lavoro delle tre sessioni predisposte, riferite all'ambito marino-costiero, ambienti lagunari, di acque di dolci, suoli e rifiuti, ha evidenziato una maggiore esperienza delle metodologie ecotossicologiche e dei recepimenti normativi messi in atto sugli ambienti marino costieri e la necessità di ulteriori approfondimenti negli altri ambienti. In particolare, si riportano le sintesi dei lavori di gruppo riguardanti l'ambito marino costiero. Per gli altri ambiti si auspica la formazione di specifici gruppi di lavoro per l'individuazione di idonee batterie di saggi da utilizzare nei diversi casi applicativi. Questi dovranno riguardare gli ambienti lagunari, dove è stato emanato il decreto per la gestione dei sedimenti dragati nella laguna di Venezia (nuovo protocollo fanghi), e in generale per ambienti terrestri, dove le normative ancora scontano una minore esperienza applicativa (da tener conto del nuovo regolamento Terre e Rocce da Scavo in via di pubblicazione). Sui rifiuti è stato fatto qualcosa da ISPRA ma ancora sul piano normativo mancano riferimenti certi.

A seguire i resoconti dei gruppi di lavoro per l'ambito marino costiero.

*Gruppo di lavoro *Aliivibrio fischeri* – Fulvio Onorati*

I lavori del gruppo su *Aliivibrio fischeri* si sono aperti annunciando l'imminente pubblicazione del Quaderno ISPRA relativo allo studio collaborativo per la validazione del metodo in fase solida specifico per ambienti di acque dolci.

I coordinatori Fulvio Onorati e Gianluca Chiaretti, raccogliendo anche la domanda dell'utenza pubblica e privata nota da tempo, hanno espresso l'intenzione di procedere alla organizzazione di un circuito di interconfronto prestazionale sull'analisi di campioni reali di sedimento marino, utilizzando il protocollo SPT con *Aliivibrio fischeri* in fase solida.

A tal fine sono state condivise le seguenti fasi, senza al momento stabilirne una scadenza, data la complessità dell'operazione, soprattutto sotto il profilo logistico:

- Sondaggio nazionale per la verifica del numero di soggetti partecipanti esteso anche ai soggetti non presenti all'incontro. Dal momento che da una stima teorica i soggetti partecipanti potrebbero essere diverse decine, diviene essenziale stabilire il numero dei laboratori che prenderanno parte al circuito, in quanto da esso dipenderanno i quantitativi di campione reale che dovrà essere prelevato, con tutti i riflessi logistici che ne conseguono.
- Redazione di un protocollo condiviso di tutte le fasi logistiche e analitiche, con particolare dettaglio nella tempistica in quanto, dovendo "lavorare" su campioni "freschi", sarà determinante una sincronizzazione delle attività analitiche tra tutti i laboratori. Il tempo che dovrebbe intercorrere dal campionamento all'esecuzione del saggio finale non dovrebbe, infatti, superare i 10 giorni.
- Ipotesi sullo svolgimento del numero di test da eseguire per l'interconfronto al fine di ottenere una sufficiente robustezza statistica. È emersa come opinione comune la necessità di effettuare non meno di 4-6 prove analitiche sul campione oggetto.

Nel frattempo, ISPRA dovrà effettuare al proprio interno alcune verifiche, tra cui le più importanti sono:

- Selezione dei potenziali siti di campionamento che potrebbero essere utilizzati al fine di ottenere un campione di sedimento omogeneo e certamente tossico. A tal proposito sono state fatte diverse ipotesi (Porti di Livorno e Piombino, SIN di Gela) per le quali tuttavia la distanza gioca un ruolo importante per una logistica efficace di spedizione dei campioni. In tal senso il Porto di Fiumicino potrebbe essere un buon candidato, considerate la vicinanza dai laboratori ISPRA, gli ottimi rapporti con l'AdSP e la qualità nota dei sedimenti dei suoi fondali;
- Verifica interna sulle dotazioni di laboratorio per assicurare l'omogeneizzazione del/dei campioni e la preparazione delle aliquote da inviare ai partecipanti;
- Definizione delle modalità di esecuzione di saggi preliminari dei campioni di prova per la scelta del sito di campionamento definitivo e comunque immediatamente prima della spedizione per verificare la reale tossicità e quindi l'idoneità al circuito.

Gruppo di Lavoro Crassostrea gigas – Lorenzo Morroni

Conclusioni operative sintetiche

- 1) Difficoltà di reperimento di *C. gigas* a causa delle soste doganali degli ordini fatti alla Guernsey Sea Farms dopo la Brexit. Problema parzialmente risolto da alcuni singoli laboratori facendo uso di un intermediario terzo che, a pagamento, riceve le ostriche in dogana e le consegna al laboratorio. Tale procedura, oltre che dispendiosa, non è però generalizzabile e adottabile da ogni laboratorio interessato.
- 2) Programmato, di conseguenza, un tentativo di ISPRA ad ottenere presso il ministero della Salute una deroga diretta alla legge per poter importare gli animali.
- 3) In parallelo alla procedura riportata nel punto 2), visto l'esito incerto, potrà essere valutato come specie test alternativa il riccio di mare *Paracentrotus lividus*, che risulta attualmente la strada più facilmente percorribile.
- 4) Per ovviare al campionamento in mare e al periodo riproduttivo sempre più ristretto (i principali limiti della specie) sarebbe utile valutare la possibilità di un accordo con ISPRA e Costa (Acquario di Genova, Livorno e Cattolica), in modo da mantenere gli organismi necessari alla conduzione dell'interconfronto con i laboratori interessati.
- 5) Infine, come prospettiva di lungo periodo, potrà essere avviato un interconfronto coi laboratori interessati sul saggio di sviluppo embrionale del polichete *Ficopomatus enigmaticus*, su cui attualmente è in sviluppo uno specifico protocollo nato dalla collaborazione tra ISPRA e CIBM.

Gruppo di Lavoro Acartia – Isabella Buttino

Criticità:

reperimento organismi,
allestimento test 7 giorni,
confronto tra ceppo baltico e adriatico

Proposte:

revisione del quaderno test a 7 giorni riguardo soprattutto la schiusa delle uova nei test di validazione e la possibilità di utilizzare piastre multiwell per ridurre anche i volumi di elutriato
necessità di inviare materiale (aggiornamento carta servizi)
necessità di svolgere corsi (sempre previsti dalla carta dei servizi)

Inviato a tutti il link dei corsi pubblicati sul sito youtube Ispra.

Per quanto riguarda gli interconfronti quelli risultano difficilmente attuabili senza un supporto in termini di personale che se ne possa far carico. Sono molto impegnativi e time-consuming.

Gruppo di Lavoro Pesci – Livia Mariani

Il Gruppo " Pesci " è attualmente costituito da una decina di componenti rappresentanti laboratori dell'Italia centro-settentrionale appartenenti ad aziende private, allo Zooprofilattico di Torino e all'Università di Siena.

La maggioranza utilizza la specie di acqua dolce Danio rerio nell'applicazione del FET, ma ha evidenziato la necessità di disporre di corsi di formazione per poter allevare e utilizzare pesci adulti e di altre specie in esperimenti e test ecotossicologici. Attualmente tali corsi, obbligatori secondo la normativa vigente in materia, risultano scarsamente fruibili agli operatori poiché sono organizzati solo da pochissimi istituti di zooprofilassi e dall'Istituto Superiore di Sanità con una frequenza sporadica, nemmeno annuale.

In relazione a questa esigenza, fondamentale per poter utilizzare i pesci dopo lo stadio di post-larve, il gruppo auspicherebbe una sollecitazione verso le istituzioni competenti per ampliare l'offerta formativa in termini spazio/temporali:

- autorizzando più enti/istituti ad organizzare i corsi di formazione, ampliandone così la fruibilità sul territorio nazionale;

-indicando e definendo una periodicità almeno annuale o semestrale.

Nelle more di risolvere questa problematica ed al fine di evitare la necessità di ottenere autorizzazioni specifiche per allevare ed utilizzare i pesci allo stadio di giovanile/adulto nei laboratori, la Referente del Gruppo, sta ipotizzando di formulare una proposta progettuale per eseguire esperimenti e test ecotossicologici con uova di specie ittiche marine mediterranee.

Obiettivi futuri:

- 1) Reclutamento ed inclusione nel Gruppo di Lavoro di altri laboratori già autorizzati ad utilizzare i pesci giovanili.
- 2) Messa a punto e condivisione di una procedura per eseguire test ecotossicologici acuti con uova di specie marine comunemente allevate e disponibili durante l'anno (*Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*).
- 3) Organizzazione di esercizi interlaboratorio per utilizzare specie autoctone marine in test ecotossicologici, al fine di riprendere il percorso di normazione avviato in passato con il precedente GdL ad hoc Pesci.

Gruppo di Lavoro Biomarker – Ginevra Moltedo

La riunione del GdL Biomarker, tenutasi il 22 nov 2023 durante la 3 giornata di ecotossicologia a Livorno, e' stata quest'anno inaspettatamente ricca di adesioni: agenzie, universita', enti privati. Del vecchio gruppo era presente solo Maura Benedtti dell'Università politecnica delle Marche (Ancona), oltre la coordinatrice Ginevra Moltedo (ISPRA). In generale, si è registrato un grande interesse da parte dei nuovi partecipanti per le analisi dei biomarker, sia in organismi marini che di acqua dolce, animali e vegetali, per monitorare diversi tipi di ambienti e matrici ambientali: fiumi, mare, terra, ma anche rifiuti.

Dopo un giro di tavolo per conoscersi e per capire l'origine e l'interesse dei nuovi partecipanti al gruppo, si è dato un aggiornamento sulle attività del gruppo.

In particolare, relativamente all'obiettivo di armonizzare i protocolli metodologici delle analisi di biomarkers a livello nazionale, in previsione di un ring-test per andare verso la standardizzazione degli stessi, si è dato un aggiornamento in merito allo stato di avanzamento del Manuale metodologico per analisi di biomarker in organismi marini, attività che sta svolgendo il GdL coordinato dalla dott.ssa G. Moltedo dell'Ispira.

E' stato spiegato che, a fine 2017 è stato dato un Questionario di ricognizione ai principali laboratori italiani che si occupano di analisi di biomarker in mare ed i risultati sono stati elaborati e sono state prese delle decisioni ai fini del Manuale. Per il momento il Manuale è stato deciso che si focalizzerà su organismi marini, quali mitili e pesci, e sui biomarker "più comuni" tra i laboratori italiani del settore, utili per il monitoraggio marino nazionale. Il primo step per definire i protocolli condivisi armonizzati ha previsto il confronto tra i protocolli indicati dai laboraori del GdL per ciascun biomarker e, sulla base di un punteggio (FPP) assegnato a ciascun protocollo (in base a criteri condivisi), è stato selezionato un protocollo per ciascuno dei biomarker "più comuni", di cui si sta scrivendo il testo in italiano.

Una volta pubblicato il Manuale, si potrà pensare di eseguire esercizi di interconfronto ai quali potranno essere invitati piu' soggetti (es. ARPA del SNPA), compresi i partecipanti alla riunione del 22 Nov, se lo vorranno.

Ad oggi sono stati definiti e scritti i testi per i protocolli di una quindicina di biomarker e si sta procedendo con la scrittura degli altri.

Contiamo di pubblicarli il prima possibile, possibilmente nei primi mesi del 2024.

Gruppo di Lavoro Alghe – Andrea Tornambè

Dopo aver illustrato l'intenzione di ISPRA di attivare un circuito d'interconfronto sul saggio con *P. tricorutum* secondo la ISO 10253 per il 2024, si è discusso della possibilità di pubblicare un quaderno Ispra che riporti il protocollo in piastra già oggetto dello studio collaborativo del 2022. La stesura di tale quaderno verrà verosimilmente pianificata a valle di questo primo esercizio d'interconfronto prestazionale.

Un'altra questione discussa è stata il calcolo delle ECr50: l'invito è ad usare, per questo esercizio, tutti lo stesso foglio di calcolo per ridurre l'incertezza dovuta a questa variabile (a volte determinante). L'intenzione è di fornire una versione bloccata del foglio con istruzioni dettagliate. Anche la scheda di restituzione dati sarà dettagliata e probabilmente verranno richiesti risultati grezzi e tutte quelle informazioni che potranno consentire un approfondimento dell'influenza di certe varianti sul risultato finale, anche tramite confronto con lo studio collaborativo pregresso.

Parallelamente verrà condiviso da ISPRA un protocollo per la *Dunaliella tertiolecta* che, come sappiamo, non ha una norma ad hoc specifica. In seguito verrà valutata la possibilità di uno studio collaborativo su questa alga.

Presentazione del circuito d'interconfronto sul saggio algale marino secondo la norma ISO 10253:2016 – annualità 2023/24

Organizzazione:

Andrea Tornambè, Claudia Sebbio, Fulvio Onorati, Cristina Martone, Sabrina Barbizzi

Modalità previste

- Il circuito verrà attivato attraverso la rete SNPA (pubblicizzato su sito ISPRA) e sarà aperto alla partecipazione di Laboratori privati
- l'interconfronto si baserà sulla tossicità di una sostanza di riferimento (bicromato) e di un campione incognito inviato da ISPRA
- verrà fornito un protocollo e una scheda dettagliata di restituzione dati
- verrà utilizzato un unico foglio di calcolo (REGTOX)
- prima data possibile: febbraio 2024
- Il circuito potrà essere mantenuto con cadenza annuale