

# ATTI

Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche  
in ambienti acquatici e matrici contaminate

Atti delle giornate di studio su  
Emergenza Ambiente:  
l'ecotossicologia come strumento di gestione

---



Fondazione Livorno Euro Mediterranea  
Livorno - Piazzale del Pamiigione, 1/2



6<sup>a</sup> edizione  
Giornate di Studio  
11-13 novembre 2014



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

**Giornate di Studio - 6<sup>a</sup> edizione**

**Atti delle giornate di studio su  
Emergenza Ambiente:  
l'ecotossicologia  
come strumento di gestione**

**Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche  
in ambienti acquatici e matrici contaminate**

**ATTI**

**Livorno, 11-13 novembre 2014**

## **Informazioni legali**

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa pubblicazione.

**ISPRA** - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale  
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma  
[www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)

ISPRA, Atti 2015  
ISBN 978-88-448-0711-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

## **Elaborazione grafica**

ISPRA

*Grafica di copertina:* Sonia Poponessi

*Foto di copertina:* Marco Faimali, Isabella Buttino, Marina Pulcini

## **Coordinamento editoriale:**

Daria Mazzella

**ISPRA** - Settore Editoria

MAGGIO 2015

**A cura di:**

Cristian Mugnai (CRA15/DIP. 2)

**Con la revisione di:**

David Pellegrini (CRA15/DIP. 2)

# INDICE

---

PREMESSA.....	p. 6
POSITION PAPER: L'indagine biologica in ecotossicologia: una visione strategica criticità, obiettivi e soluzioni da parte di enti di controllo, di istituti di ricerca e del mondo delle imprese.....	p. 7
Fioriture della microalga <i>Ostreopsis ovata</i> lungo le coste italiane dall'emergenza del 2005 ad oggi: monitoraggio e gestione.....	p. 27
L'approccio ecotossicologico per la valutazione della tossicità da <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> : stato dell'arte.....	p. 35
Chemical characterization and ecotoxicity of three soil foaming agents used in mechanized tunneling.....	p. 41
Effect of ketoprofen on freshwater model organisms bioassays and oxidative stress biomarkers.....	p. 46
Batteria di test ecotossicologici nel monitoraggio dell'acqua di risaia e dei canali adduttori delle provincie di Vercelli e Novara nel periodo di utilizzazione dei fitofarmaci.....	p. 52
Saggi biologici per il controllo della tossicità in acque da ittiocoltura contenenti antibiotici dopo fotocatalisi con luce UV-A e nano-TiO <sub>2</sub> immobilizzato.....	p. 56
Convalida della procedura per la determinazione di ecotossicità dei rifiuti (H14): risultati dello studio collaborativo ispra sc007.....	p. 60
L'analizzatore EasyChem Tox per il saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti ( <i>Vibrio fischeri</i> ): verifica dei criteri di precisione e validità.....	p. 68
Prove di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larva con sacco vitellino del danio zebra ( <i>Danio rerio</i> ) [oeed n. 212 e 236]: messa a punto dei test in previsione della certificazione bpl.....	p. 76
"Fish Embryo Toxicity Test (FET)": potenziale alternativa al test acuto su pesci.....	p. 83
Nuovo approccio metodologico per misure rapide in ecotossicologia.....	p. 88
Valutazione ecotossicologica di un suolo contaminato da idrocarburi sottoposto a bonifica.....	p. 92

Assessment of the ecotoxicological effects related to the use of natural organic coagulants in the primary treatment of wastewaters at urban and industrial level.....	p. 97
L'esperienza di ARPA Umbria: 10 anni di controlli ecotossicologici delle acque di scarico.....	p. 103
Saggi biologici sui sedimenti marino costieri della Toscana al fine di identificare la matrice sulla quale effettuare la valutazione della classe di qualità ambientale: anni 2012-2013 .....	p. 108
Mutagenicità delle acque reflue urbane depurate.....	p. 112
I ricci di mare nella ricerca ecotossicologica, possibili strategie per la disponibilità continua di gameti. risultati preliminari.....	p. 119
Esempio di Analisi di rischio ambientale applicata ai metalli: area marina del Golfo della Spezia.....	p. 126
Progetto gambero di acqua dolce: esempio di applicazione di batterie di saggi ecotossicologici .....	p. 133
Valutazione integrata dello stato di salute degli ecosistemi del Bacino idrografico del fiume Volturno .....	p. 142
Batterie di saggi ecotossicologici: sintesi e prospettive dopo 13 anni di controlli ambientali in provincia di Cuneo .....	p. 147
Il progetto CARISMA: un esempio di monitoraggio ambientale integrato per la definizione del rischio ecologico da agenti antivegetativi. ....	p. 152
Valutazione delle conseguenze ambientali degli incidenti rilevanti: caratterizzazione delle sostanze presenti sul territorio nazionale e risultanze dell'analisi dell'esperienza storica di incidenti rilevanti con effetti ambientali ...	p. 168
Emergenza "Eurocargo Venezia": studio del bioaccumulo di metalli critici nel macroinvertebrato di fondi batiali <i>Calocaris macandreae</i> .....	p. 176
Saggio di embriotossicità <i>in situ</i> per la valutazione della qualità ambientale di acque marine costiere: risultati preliminari con il riccio di mare <i>Paracentrotus lividus</i> .....	p. 181

# PREMESSA

---

La 6° edizione delle Giornate di Studio “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate” (Livorno, 11-13 Novembre 2014) ha rappresentato una sostanziale novità rispetto alle precedenti edizioni, essendo principalmente incentrata sull'aspetto della ecotossicologia come strumento di gestione, sia nelle emergenze ambientali, oltre che dei controlli ordinari. Nello specifico, sono state affrontate tematiche proposte da Enti di Ricerca, Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente e Privati, attraverso la presentazione di un numero considerevole di elaborati scientifici (poster e comunicazioni) e di osservazioni tecnico-operative sullo stato delle conoscenze e criticità attuali, sui nuovi approcci scientifici e metodologici, sui criteri di integrazione, per una corretta gestione del territorio.

Le sessioni, coordinate da tre referenti, uno del mondo della ricerca, un rappresentante delle Agenzie e un portatore di interesse del mondo del privato, hanno riguardato: i contaminanti emergenti o emergenze future (Nanomateriali, microplastiche, tossine algali, specie aliene, ecc.); l'applicazione dell'Ecotossicologia nella definizione della caratteristica H14 e nel regolamento REACH; le metodologie innovative di indagine ecotossicologica; l'ecotossicologia nei controlli e nelle emergenze ambientali

Le giornate di studio sono state precedute da un momento di discussione mediante la creazione di 3 focus group, dedicati rispettivamente al confronto su tematiche ecotossicologiche nell'ambito della ricerca scientifica, delle attività delle agenzie ambientali e del ruolo dei privati. Dettagli sulla struttura, metodologia, contributi e risultati di questo interessante momento di confronto sono illustrati nel Position Paper di seguito riportato.

L'iniziativa ha riscosso un notevole successo, con la presentazione di 107 contributi (62 poster e 45 comunicazioni) e una notevole affluenza durante le 3 giornate.

Di seguito si riportano i contributi tecnico scientifici i cui autori hanno autorizzato la pubblicazione come ATTI della 6° edizione delle Giornate di Studio “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate”. Un numero consistente di contributi è stato sottoposto alla rivista *Ecotoxicology and Environmental Safety* per l'eventuale pubblicazione come special ISSUE e per questo motivo la presente edizione degli atti potrebbe in seguito essere oggetto di aggiornamento, includendo eventuali ulteriori contributi non inclusi nella special ISSUE sopra menzionata.

David Pellegrini e Cristian Mugnai

# POSITION PAPER: L'INDAGINE BIOLOGICA IN ECOTOSSICOLOGIA: UNA VISIONE STRATEGICA CRITICITÀ, OBIETTIVI E SOLUZIONI DA PARTE DI ENTI DI CONTROLLO, DI ISTITUTI DI RICERCA E DEL MONDO DELLE IMPRESE.

di Marco Francese

Shoreline Soc. Coop.  
c/o Area Science Park, Loc. Padriciano 99, 34149 Trieste  
e-mail: marco.francese@shoreline.it

---

## *L'indagine biologica (bioassay): indispensabile strumento per la valutazione degli effetti*

Per raggiungere l'obiettivo della valutazione causa-effetto di sostanze xenobiotiche si deve procedere con un approccio multidisciplinare, integrando i metodi chimico/fisici con i metodi biologici. Attualmente, si ritiene che i criteri da seguire nell'eseguire saggi biologici ed altre analisi su base biologica siano impostati sulla semplicità, sull'economicità e siano in grado di dare informazioni inequivocabili sull'alterazione di un sistema.

Dai primi saggi di Ellis con la *Daphnia magna* ad inizio del secolo scorso, si è assistito allo sviluppo di numerosi test tra gli anni '70 e '90, accompagnati da varie forme di standardizzazione come i manuali EPA (Environmental Protection Agency) o i protocolli ASTM e OECD o ancora i metodi dei quaderni CNR IRSA. L'obbligo normativo per i saggi biologici è divenuto via via sempre più presente nell'ultimo decennio e di pari passo la ricerca scientifica è aumentata, sia per l'individuazione di nuovi metodi o di nuove specie sia per migliorare la sensibilità dell'analisi. Siamo così giunti ai giorni nostri in cui le specie prese in considerazione sono numerosissime e per ognuna di esse esistono spesso sia saggi acuti che cronici, oppure per quelle più utilizzate troviamo gli end-point letali che si accompagnano a quelli sub-letali, per complimentarsi poi con biomarker fisiologici o test di genotossicità. Un universo scientifico dunque, ricco di approcci diversi e di aggiornamenti continui, con giudizi sempre più elaborati e rappresentativi.

Questo mondo esperto non riesce però a compenetrare facilmente l'altro universo, quello della normativa e di quelle indicazioni tecniche indispensabili per diffondere l'indagine biologica, ovvero il bioassay. Dalla Legge Merli al Decreto legislativo 152 del 2006 vi è stata sempre attenzione nei riguardi degli aspetti di metodo per l'indagine ambientale, ma prediligendo l'analisi chimica dove l'approccio interpretativo è del tipo "pass or fail", basate su risposte binarie o su una limitata serie di classi di risposta. L'indagine a base biologica non è mai così definita, in quanto il risultato è sempre un valore relativo ad una condizione ottimale ed è sempre dipendente dall'esperienza dell'operatore. Esistono quindi delle difficoltà oggettive, tra le quali le più importanti sono: il riconoscimento di uno standard analitico di qualità uniforme per i saggi condotti, la rappresentatività spazio-temporale dei campionamenti, la significatività del giudizio espresso e l'identificazione delle relazioni causa-effetto.

E proprio ad occuparsi di questi aspetti si inserisce l'attività certosa del Gruppo di Lavoro "Tossicità di acque salate/salmastre e sedimenti" gestito da ISPRA ed ospite

di UNICHIM, collegato ad altri Gruppi di Lavoro ad Hoc ed amplificato nel Comitato Scientifico <sup>1</sup> delle Giornate di Studio in Ecotossicologia, appuntamento biennale giunto alla sesta edizione nel 2014. L'intento di tutti gli esperti coinvolti è quello di aumentare l'omogeneità dei saggi biologici e delle altre indagini su base biologica, di superare le difficoltà che sempre intercorrono tra la ricerca sperimentale e l'applicazione routinaria. In questo modo da anni fanno azione di supporto ai legislatori per l'introduzione della valutazione dell'effetto sulla componente biotica, da parte delle matrici indagate, come criterio indispensabile nelle nuove norme in tema di ambiente e nelle revisioni di quelle precedenti.

### ***L'esigenza di condivisione e l'opportunità delle giornate di studio***

L'idea di introdurre un'attività con tecniche di partecipazione in apertura dei lavori è nata dall'esigenza di favorire la conoscenza ed il confronto tra le tre anime del mondo dell'ecotossicologia: gli enti pubblici ed istituzionali, le realtà che fanno ricerca in questo campo ed i laboratori di analisi, prevalentemente privati.

La finalità di questo percorso era quella di far emergere criticità ed esigenze nell'operare quotidiano, sia sul piano analitico che su quello interpretativo, così come di ricercare possibili soluzioni, in particolare nella modalità di networking che poteva nascere proprio dai partecipanti alle Giornate di Studio. Un network tecnico attivo che avrebbe in futuro anche la funzione di dare ai Gruppi di Lavoro ad Hoc indicazioni già condivise da portare avanti in sede ISPRA o presso altri Enti. I risultati di questo primo incontro tra esperti in Focus Group creati per l'occasione, sono stati lo spunto per una nuova lettura delle Giornate di studio e sono confluite alla Tavola Rotonda nel pomeriggio dell'ultimo giorno.

### ***La metodologia applicata nei focus group***

Il lavoro in gruppo è stato effettuato declinando la metodologia *World Cafè* a questo contesto: domande chiare hanno aperto sessioni diverse in ognuna delle quali i partecipanti si sono spostati da una postazione all'altra, discutendo tra di loro in un processo di *cross pollination*, sia tra soggetti provenienti da contesti simili sia tra soggetti molto eterogenei. I principi generali della metodologia sono riportati nell'immagine a seguire.

Nella presentazione ai partecipanti, oltre alla spiegazione della metodologia usata, è stata illustrata la finalità di questo percorso ed in particolare nelle modalità di networking che si possono metter in atto proprio a partire dai partecipanti alle Giornate di Studio.

---

<sup>1</sup> Comitato Scientifico: A. Arizzi Novelli (ARTA Abruzzo), F. Bandini (ARPA EMR), R. Baudo (ISE-CNR), G. Benedettini (ARPAT), I. Buttino (ISPRA), R. Cardente (ECOTOX), D. Conti (ISPRA), M. Faimali (ISMAR-CNR), M. Francese (Shoreline), C. Giarei (Eurofins), T. Leoni (ARPAM), G. Libralato (UNIVE), L. Mariani (UNIROMAII), V. Matranga (IBIM-CNR), C. Mugnai (ISPRA), F. Onorati (ISPRA), D. Pellegrini (ISPRA), F. Regoli (UNIVPM), M. Ultrè (ECOTOX), A. Viarengo (UNIPMN), A. Volpi Ghirardini (UNIVE).

Segreteria: [ecotossicologia@isprambiente.it](mailto:ecotossicologia@isprambiente.it)

	<b>LE REGOLE DEL WORLD CAFÈ</b>	<b>PARTECIPA ASCOLTANDO ATTENTAMENTE</b>	<b>SVILUPPA IDEE SUI CONTRIBUTI DI CIASCUNO</b>
<b>CONCENTRATI SU CIÒ CHE È IMPORTANTE</b>	<b>CONTRIBUISCI CON LE TUE CONOSCENZE</b>	<b>PARLA CON RAZIONALITÀ E PASSIONE</b>	<b>ASCOLTA PER COMPNDERE</b>
<b>COLLEGA E CONNETTI LE IDEE</b>	<b>RICERCA INSIEME AGLI ALTRI INTUZIONI E SOLUZIONI</b>	<b>SCARABOCCHIA E DISEGNA LIBERAMENTE</b>	<b>FISSA LE IDEE SUI SUPPORTI DISPONIBILI</b>

Per facilitare questo fenomeno, la prima sessione era rivolta ad una discussione interna alla stessa categoria di *stakeholder*, ovvero gli enti, gli istituti di ricerca e le realtà private. La seconda e terza sessione invece invitavano i partecipanti a mescolarsi tra di loro evitando possibilmente di incontrare il minor numero possibile di persone con cui avevano già dialogato. Le tre sessioni ai tavoli avevano la durata di circa 30 minuti l'una e la plenaria finale di circa un'ora, che sommate ai saluti ed alle premesse iniziali hanno impegnato tutti per un pomeriggio intero.

Le tre domande poste erano incentrate sulle criticità riscontrate e sulle idee per risolverle, come viene di seguito riportato:

- "quale criticità o aspetto prioritario vuoi condividere con il tuo gruppo di riferimento?"
- "quale criticità o aspetto prioritario vuoi condividere con gli altri?"
- "Quali strategie di networking? Quali soluzioni?"

Questo metodo ha stimolato le conversazioni informali su questioni chiare, ha facilitato l'ascolto formando piccoli gruppi ad ogni sessione, ha fornito supporti per raccogliere le idee ed ha creato un momento finale plenario dove sintetizzare il risultato finale e condividere priorità e possibili soluzioni o strategie.

Inoltre, aspetto non previsto dalla metodologia, sono state previste le figure degli osservatori sapienti, esperti in eco tossicologia che si muovevano liberamente tra i tavoli e si appuntavano aspetti tecnici e particolari, che nel percorso di sintesi previsto dalla metodologia applicata rischiavano di venir diluiti. Le osservazioni che hanno riportato sulle specifiche categorie di partecipanti son state poi tenute in considerazione nell'elaborazione finale.

I partecipanti ai Focus Group sono stati in media 48, considerando il fatto che, come in ogni evento di partecipazione non coercitivo, alcune persone sono arrivate dopo, altre sono andate via prima ed ancora altre, arrivate tardi, han preferito assistere senza partecipare; il numero quindi complessivo dovrebbe essere maggiore ma è stata fatta una stima media dei partecipanti attivi nelle 3 sessioni.

### *Limiti e vantaggi del processo partecipato*

Anche il processo partecipato ha dimostrato dei limiti di cui tener conto per migliorare le esperienze future:

- la rappresentatività tra i partecipanti determina migliore condivisione e l'equità nel numero tra le diverse categorie di stakeholder dev'essere preliminare e si lega agli aspetti promozionali;
- la promozione di un appuntamento di Focus Group dev'essere selettiva reclutando coloro che vogliono partecipare e dev'essere insistente per avere un numero adeguato di partecipanti;
- non basta l'incontro "una tantum" per passare dalla condivisione di idee al dettaglio dei vari aspetti ed alle azioni da attuare, sia di breve che di lungo periodo, ma è stata condivisa la necessità di una periodicità di appuntamenti, plenari o anche solo interni alle diverse categorie di stakeholder;
- il Focus Group fisico ha un limite nella frequentazione, anche se fatto di volta in volta in luoghi diversi.

All'interno del gruppo si sono create polarità e sproporzioni in parte prevedibili ed in parte inaspettate. Le vogliamo evidenziare in questo paragrafo per sottolineare un aspetto gestionale da modulare in situazioni simili future:

- le aziende hanno trovato più affinità con gli enti di controllo che con gli istituti di ricerca, probabilmente per consolidata abitudine ad operare in ambiti applicativi;
- la visione dei ricercatori, siano stati accademici o appartenenti agli enti era quasi sempre simile, facendo presagire una comunità di intenti per il futuro;
- tutti i partecipanti hanno dimostrato disponibilità al dialogo sulla criticità emerse, ma raramente si è assistito alla condivisione delle esigenze dei committenti, così come alle modalità con cui i cosiddetti clienti si interfacciano con i laboratori che eseguono indagini di tipo biologico.

Però, al di là dei limiti manifestatisi o delle sinergie che si son venute a creare in questa prima sperimentazione di metodo, va messo in evidenza che il processo partecipato tra ricercatori e produttori è stato giudicato dagli stessi stakeholder come strategico, a patto che mantenga le seguenti caratteristiche:

- deve coinvolgere tutti i diversi attori in proporzione rappresentativa;
- non deve annoiare applicando metodologie innovative e molto inclusive;
- ad ogni Focus Group può essere abbinato un seminario specifico, tenuto da un esperto riconosciuto;
- ogni appuntamento dei Focus Group potrebbe divenire un breve corso di aggiornamento per facilitare la possibilità di parteciparvi, potendolo magari abbinare ad un breve e specifico seminario;
- il numero di sessioni plenarie dev'essere inferiore rispetto a quello dei Focus Group, poiché si riconosce in questi ultimi una maggiore specificità e focalizzazione;
- all'unanimità sono state ritenute indispensabili la creazione di un Focus Group Permanente e di una Piattaforma web per i Focus Group.

## *I risultati da raccogliere per il futuro*

Uno dei passi fondamentali di un *Position Paper* è di sintetizzare il lavoro eseguito e sulla base di questo esprimere delle opinioni. Cogliendo l'opportunità di quanto accaduto vogliamo fare anche un passo indietro e dare l'opportunità a tutti di apprezzare i contributi forniti dai partecipanti ai Focus Group.

Per facilitarne la lettura e quindi dare un primo filo logico all'interpretazione di quanto emerso, tutti i contributi sono stati organizzati in record che li qualificavano nel cluster di appartenenza sia secondo i parametri prestabiliti, ovvero criticità importante o aspetto prioritario o soluzione ipotizzata, oppure secondo la categoria dello stakeholder, ovvero enti o istituti di ricerca o realtà private. Quindi i dati sono stati raggruppati per macroargomenti o famiglie concettuali o *cluster* tematici, come spesso vengono definiti. Li riportiamo in un allegato trascritti senza interpretazione, affiancati dalle foto del poster riassuntivo realizzato durante i 3 giorni di convegno e di particolari dei canovacci usati per la discussione, ovvero le tovaglie dei tavoli del nostro *World Cafè*. (Allegato 1).

Da questa prima interpretazione di quanto emerso vogliamo sottolineare gli aspetti legati a numeri e proporzioni. I contributi in termini di criticità sono stati maggiori (39) degli aspetti prioritari (15), mentre notevole è stata la proposta di soluzioni ipotizzate (18). Ben 32 sono stati gli argomenti condivisi da tutte e tre le categorie di stakeholder, mentre 7 quelli tra enti ed imprese private e 6 quelli tra enti e istituti di ricerca. Le criticità e gli aspetti prioritari che interessavano unicamente gli enti erano 9, mentre 10 quelli degli istituti di ricerca e 8 delle aziende private.

Nel proseguo di questo lavoro i contributi di tutti sono stati rielaborati riconducendoli all'interno di una *SWOT Analysis* semplificata, mostrando i punti di forza e quelli di debolezza, le minacce e le opportunità: due campi positivi e due negativi, due condizionati dal mondo interno all'universo di chi si occupa di eco tossicologia e due generati dal resto del mondo che si relaziona con questo.

Nella rappresentazione riportata nella pagina seguente, i 4 quadranti rappresentano dunque i punti di forza interni (*strenghts = S*), i punti di debolezza o limiti interni (*weaknesses = W*), le opportunità esterne (*opportunities = O*), le minacce o pericoli esterni (*threats = T*). Racchiudono tutto ciò che è stato detto nei Focus Group ripartendoli in un doppio gradiente tra campi positivi ("+") e negativi ("-"), tra aspetti interni ("in") e quelli influenzati dall'esterno ("out").

Per aumentare il livello di informazione, a fianco di ogni contributo emerso ai tavoli del World Cafè viene indicato chi ha condiviso tale concetto, evidenziandolo con il colore che lo aveva contraddistinto durante tutta la durata delle Giornate di Studio: rosso (●) per chi rappresentava un ente, verde (●) per chi apparteneva ad un istituto di ricerca e giallo (●) per chi veniva da un'impresa privata.

In questo modo nella nostra analisi SWOT è possibile osservare anche una sorta di ordine gerarchico, dove si ritiene prioritario ciò che è stato condiviso dai rappresentanti di tutte e tre le categorie di stakeholder, poi da due di loro ed infine solo da coloro che si contraddistinguevano per un colore unico.

**PUNTI DI FORZA INTERNI (STRENGTHS)**

S: possibile produrre protocolli aggiornati più frequentemente ●●●

S: produrre allegati tecnici non inseriti nelle norme e quindi aggiornabili ●●●

S: è possibile fare linee guida utili alla semplificazione normativa ●●●

S: possibile integrare le risorse ●●●

S: creare circuiti interconfronto con una regia centrale ●●●

S: favorire l'integrazione pubblico - privato ●●●

S: la condivisione di diversi stakeholder dà credibilità in UE ●●●

S: si può creare un tavolo permanente pubblico-privato per monitorare le criticità ●●●

S: si può creare un tavolo permanente pubblico-privato riconosciuto a livello ministeriale ●●●

S: va creata una piattaforma del tavolo permanente, anche con blog ●●●

S: va creato strumento web riservato per scambio di esperienze ●●●

S: va creato un sito delle Giornate di Studio con video in streaming ●●●

S: possibile fare dei centri di coordinamento e di indirizzo ●●●

S: possibile fare dei centri per il coordinamento ●●●

S: possibile fare dei centri per interconfronti ●●●

S: ci si può collegare in un co-network con SETAC ●●●

S: possibile creare dei network tra laboratori specializzati ●●

S: creare centri di eccellenza con strumenti ●

S: creare centri di riferimento diffusi sul territorio nazionale ●

S: utilizzare frequentemente la condivisione via twitter ●

S: avere una standardizzazione più metodica ●

S: fare più sperimentazione con le batterie ●

S: coinvolgere privati in interconfronti ●

S: ricercare preparative più semplici e più standard ●

**PUNTI DI DEBOLEZZA O LIMITI INTERNI (WEAKNESSES)**

W: mancano interconfronti più frequenti per la validazione di protocolli ●●●

W: mancanza di circolazione dell'informazione in generale ●●●

W: mancanza di circolazione dell'informazione nel settore pubblico ●●●

W: mancano procedure condivise tra ISPRA e Agenzie ●●●

W: manca confronto tra stakeholder, sia diversi che simili ●●●

W: mancanza di giudizio/interpretazione omogeneo ●●●

W: mancano criteri di giudizio omogenei ●●●

W: mancanza di giudizio integrato per le batterie ●●

W: manca la correlazione tra la preparativa ed il destino del campione ●●

W: assenza di tempo per la ricerca e le standardizzazioni ●●

W: carenza di formazione degli operatori ●●

W: carenza di personale negli enti ed agenzie ●

W: mancanza di confronto interno ad enti ed agenzie ●

W: scarsa organizzazione interna agli enti ed agenzie ●

W: sovrapposizione di competenze tra enti ed agenzie ●

W: manca il confronto pubblico - privato ●

W: manca il confronto ricerca - privato e ricerca - controllore ●

W: mancano progetti congiunti ●

W: manca la circolazione delle informazioni ●

W: manca l'identificazione degli organismi bersaglio ●

W: mancano le informazioni sulle intercalibrazioni ●

W: manca una preparativa uniforme per test di lisciviazione ●

**OPPORTUNITÀ ESTERNE**  
**(OPPORTUNITIES)**

- O: rendere più confrontabili le batterie ●●●
- O: incentivare i centri unici per la produzione di specie test ●●●
- O: richiedere maggiore flessibilità e velocità di aggiornamento nella norma ●●●
- O: richiedere minore distanza tra stakeholder e la legge ●●●
- O: spingere per un riconoscimento maggiore del ruolo di ISPRA ●●●
- O: fare aggiornamento con network in UE ●●
- O: trovare finanziamenti UE ●
- O: usare organismi già validi in UE ●
- O: seguire ACCREDIA in un percorso ●

**MINACCE O PERICOLI ESTERNI**  
**(THREATS)**

- T: la burocrazia è lontana dalle esigenze della ricerca ●●●
- T: presenza di burocrazia lenta e complicata ●●●
- T: manca chiarezza legge sulla qualità e sull'accREDITAMENTO ●●●
- T: specializzazione eccessiva imposta dall'accREDITAMENTO ●●●
- T: costo alto per l'accREDITAMENTO ●●
- T: scarsa competenza auditor in eco tossicologia ●●
- T: manca codifica dei rifiuti che vengono analizzati come H14 ●●
- T: assenza di chiarezza nelle norme che inibisce la promozione del bioassay ●●
- T: le batterie test non sono previste nelle norme ●●
- T: assenza di complessità scientifica nella norma ●●
- T: aggiornamento lento della norma per includere il bioassay ●●
- T: manca l'influenza sui legislatori ●
- T: mancanza di semplificazione burocratica ●
- T: approccio unicamente economico imposto nella gestione enti ●
- T: manca un supporto che faciliti gli adempimenti verso l'accREDITAMENTO ●
- T: costo sproporzionato per sistemi di qualità rispetto a loro validità ●
- T: assenza di comprensibilità per utente che inibisce la commercializzazione ●

**OUT**

In seguito a questa prima classificazione abbiamo deciso di convertire tutti i lati negativi in aspetti positivi dando un valore proattivo, ma di differenziarli da quelli che erano già riconosciuti come tali nel processo partecipato (aspetti prioritari o opportunità esterne). Così le mancanze (weaknesses) son divenute "obiettivi indiretti" e le minacce (threats) si sono trasformate in "opportunità indirette"; i punti di forza interni (strengths) e le opportunità esterne (opportunities) hanno mantenuto il loro valore divenendo rispettivamente "obiettivi diretti" e "opportunità dirette".

In questo modo è stata ricavata una lista di possibili azioni, trasferibili ad ogni partecipante alle Giornate di Studio, che come potenziale membro di un network diffuso, potrà adoperarsi per attivarle di coloro che operano nel campo delle analisi su base biologica in eco tossicologia.

Un passo ulteriore è stato fatto differenziando quelle azioni che si ritiene possano essere attuate nel breve periodo da quelle di lungo periodo, secondo un giudizio esperto ma non condiviso. Nel riorganizzare tutte queste indicazioni proattive sono state ridefinite anche le famiglie concettuali, riprendendo ed in parte fondendo le definizioni espresse nella prima restituzione dei dati.

Questa fase ultima di rielaborazione ha offerto un ottimo spunto per un'ulteriore focalizzazione in merito ai punti sui quali si fosse concentrata l'attenzione di tutti i partecipanti ai Focus Group.

Infine ricordiamo questo passaggio non è stato condiviso poiché elaborato a posteriori, ma è stato fatto ritenendo così di avere un substrato per innescare la prossima discussione in un prossimo incontro del Focus Group per l'ecotossicologia.

Nelle pagine che seguono riportiamo le due liste.

## ***"Obiettivi diretti o indiretti" e "opportunità dirette o indirette" di breve periodo***

### **NORME E CHIAREZZA LEGISLATIVA**

OPPORTUNITA' INDIRETTA: chiedere più chiarezza nelle norme per far accettare il bioassay

OPPORTUNITA' INDIRETTA: chiedere più comprensibilità nelle norme per l'utente finale per favorire la commercializzazione

OBIETTIVO INDIRETTO: definire procedure condivise tra ISPRA e Agenzie

OPPORTUNITA' DIRETTA: spingere per un riconoscimento maggiore del ruolo di ISPRA

### **ACCREDITAMENTO**

OPPORTUNITA' DIRETTA: seguire ACCREDIA in un percorso

OPPORTUNITA' INDIRETTA: istituire un modo che supporti gli adempimenti verso l'accREDITAMENTO

### **PROTOCOLLI ED INTERCONFRONTO**

OBIETTIVO DIRETTO: produrre allegati tecnici non inseriti nelle norme e quindi aggiornabili

OBIETTIVO DIRETTO: produrre protocolli aggiornati più frequentemente

OBIETTIVO DIRETTO: coinvolgere più privati negli interconfronti

OBIETTIVO INDIRETTO: organizzare interconfronti più frequenti per la validazione di protocolli

OBIETTIVO DIRETTO: creare circuiti di interconfronto con una regia centrale

OBIETTIVO INDIRETTO: aumentare il tempo per la ricerca e le standardizzazioni

OBIETTIVO DIRETTO: fare più sperimentazione con le batterie

OPPORTUNITA' DIRETTA: usare organismi di specie test già validi in UE

OBIETTIVO DIRETTO: ricercare preparative più semplici e più standard

OBIETTIVO INDIRETTO: ricercare una preparativa uniforme per il test di lisciviazione

### **CENTRI COORDINAMENTO**

OBIETTIVO DIRETTO: creare centri di riferimento diffusi sul territorio nazionale

OBIETTIVO DIRETTO: fare dei centri di coordinamento e di indirizzo

OBIETTIVO DIRETTO: fare dei centri per il coordinamento

OBIETTIVO DIRETTO: creare dei network tra laboratori specializzati

### **CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI**

OBIETTIVO INDIRETTO: aumentare la circolazione delle informazioni

OBIETTIVO INDIRETTO: aumentare la circolazione dell'informazione in generale

OBIETTIVO INDIRETTO: aumentare la circolazione dell'informazione nel settore pubblico

OBIETTIVO INDIRETTO: aumentare le informazioni sulle intercalibrazioni

### **INTEGRAZIONE, ORGANIZZAZIONE (GESTIONE) E NETWORKING**

OBIETTIVO DIRETTO: favorire l'integrazione pubblico - privato

OBIETTIVO DIRETTO: creare un tavolo permanente pubblico-privato per monitorare le criticità

OBIETTIVO DIRETTO: creare un tavolo permanente pubblico-privato riconosciuto a livello ministeriale

OBIETTIVO INDIRETTO: favorire il confronto pubblico - privato

OBIETTIVO INDIRETTO: favorire il confronto ricerca - privato e ricerca - controllore

OBIETTIVO INDIRETTO: incentivare l'organizzazione interna agli enti ed agenzie

OBIETTIVO INDIRETTO: favorire il confronto interno ad enti ed agenzie

OBIETTIVO INDIRETTO: definire ruolo o competenze tra enti ed agenzie per evitare sovrapposizioni

OBIETTIVO DIRETTO: collegarsi in un co-network con SETAC

OBIETTIVO INDIRETTO: favorire il confronto tra stakeholder, sia diversi che simili

OBIETTIVO DIRETTO: incentivare la condivisione di diversi stakeholder, poiché dà credibilità in UE

OBIETTIVO INDIRETTO: promuovere progetti congiunti

OBIETTIVO DIRETTO: cercare di integrare le risorse

OBIETTIVO INDIRETTO: nuovo personale negli enti ed agenzie

OBIETTIVO INDIRETTO: organizzare la formazione degli operatori

### **NETWORK DIGITALE**

OBIETTIVO DIRETTO: creare un sito delle Giornate di Studio con video in streaming

OBIETTIVO DIRETTO: creare una piattaforma del tavolo permanente, anche con blog

OBIETTIVO DIRETTO: utilizzare frequentemente la condivisione via twitter

OPPORTUNITA' DIRETTA: fare aggiornamento con network in UE

## **"Obiettivi diretti o indiretti" e "opportunità dirette o indirette" di lungo periodo**

### **NORME E CHIAREZZA LEGISLATIVA (BUROCRATICA)**

OPPORTUNITA' DIRETTA: richiedere maggiore flessibilità e velocità di aggiornamento nella norma

OPPORTUNITA' INDIRETTA: aumentare l'influenza sui legislatori

OPPORTUNITA' DIRETTA: richiedere minore distanza tra stakeholder e la legge

OPPORTUNITA' INDIRETTA: chiedere semplificazione burocratica

OPPORTUNITA' INDIRETTA: semplificare la burocrazia nel rapporto con mondo della ricerca

OPPORTUNITA' INDIRETTA: velocizzare e semplificare la burocrazia per bioassay

OPPORTUNITA' INDIRETTA: velocizzare l'inserimento del bioassay nella norma

OPPORTUNITA' INDIRETTA: promuovere l'approccio scientifico nella norma

### **ACCREDITAMENTO**

OPPORTUNITA' INDIRETTA: richiedere chiarezza nelle leggi sulla qualità e sull'accREDITAMENTO

OPPORTUNITA' INDIRETTA: diminuire la specializzazione eccessiva imposta dall'accREDITAMENTO

OPPORTUNITA' INDIRETTA: pretendere competenza auditor in ecotossicologia

OPPORTUNITA' INDIRETTA: abbattere l'alto costo per l'accREDITAMENTO

OPPORTUNITA' INDIRETTA:proporzionare il costo per sistemi di qualità rispetto a dimensione laboratorio e a loro applicazione

### **PROTOCOLLI ED INTERCONFRONTO**

OBIETTIVO DIRETTO: avere una standardizzazione più metodica

OBIETTIVO DIRETTO: fare linee guida utili alla semplificazione normativa

OPPORTUNITA' INDIRETTA: promuovere le batterie di test nelle norme

OPPORTUNITA' DIRETTA: rendere più confrontabili le batterie

OBIETTIVO INDIRETTO: promuovere il giudizio integrato per le batterie

OBIETTIVO INDIRETTO: identificare criteri di giudizio omogenei

OBIETTIVO INDIRETTO: rendere omogenei giudizio e interpretazione

OBIETTIVO INDIRETTO: standardizzare la correlazione tra la preparativa ed il destino del campione

OBIETTIVO INDIRETTO: includere l'identificazione degli organismi bersaglio

OPPORTUNITA' INDIRETTA: richiedere la codifica dei rifiuti che vengono analizzati come H14

### **CENTRI COORDINAMENTO**

OBIETTIVO DIRETTO: creare centri di eccellenza con strumenti

OBIETTIVO DIRETTO: fare dei centri per interconfronti

OPPORTUNITA' DIRETTA: incentivare i centri unici per la produzione di specie test

### **CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI**

-

### **INTEGRAZIONE, ORGANIZZAZIONE (GESTIONE) E NETWORKING**

OPPORTUNITA' INDIRETTA: avere un approccio scientifico e non solo economico nella gestione (enti)

OPPORTUNITA' DIRETTA: trovare finanziamenti UE

### **NETWORK DIGITALE**

OBIETTIVO DIRETTO: creare strumento web riservato per scambio di esperienze

## *Una roadmap di prospettive future*

Alla luce di quanto emersa, la lezione appresa da questa prima esperienza di Focus Group è poliedrica e sicuramente apre numerosi ambiti da condividere tra *stakeholder* con diversi punti di vista per definire una Road Map di prospettive future. Innanzi tutto, vedendo che il numero delle criticità ha superato quello degli aspetti prioritari, va segnalato che esiste un certo disagio da risolvere, trasversale nel campo scientifico dell'ecotossicologia, interno alle diverse organizzazioni, ma anche presente nel rapporto tra chi vi opera ed il resto del mondo, ed in particolare con legislatori o committenti.

Parallelamente, in più momenti, la platea ha segnalato come possibile soluzione a questo disagio la necessità di mantenere un network nel quale i membri si riconoscono e dove condividono le scelte per la crescita del settore. Per far sopravvivere un gruppo numeroso e per creare una rete di conoscenza ancora più ampia, si deve continuare a coinvolgere attori di diversa estrazione, mescolando sempre le tre anime del mondo dell'ecotossicologia: gli enti pubblici ed istituzionali, le realtà che fanno ricerca in questo campo ed i laboratori di analisi privati. A tale scopo si ritiene necessario in futuro il sostegno ad un Tavolo di Confronto Permanente, promosso con efficacia ed organizzato periodicamente, dove i diversi *stakeholder* possono confrontarsi su problemi ed esigenze proprie e dove possono condividere soluzioni possibili. Questo diverrebbe un vettore bidirezionale, ovvero sia utile ad orientare le azioni di chi porta gli interessi di questo settore, come i rappresentanti di ISPRA, sia utile ad adottare nuove modalità operative per chi studia o applica metodiche di *bioassay*, consentendo così di fornire risposte sempre aggiornate ed efficaci.

Passando a considerare i dati emersi, vogliamo considerare come primo spunto per l'individuazione dei temi da affrontare nelle azioni future la sintesi fornitaci dall'elenco delle famiglie concettuali. L'attenzione sembra focalizzarsi sugli aspetti normativi e burocratici, sulla circolazione delle informazioni e sulle soluzioni per il networking. Anche gli aspetti gestionali emergono con diverse sfaccettature, in particolare evidenziando la necessità di riorganizzazione e di creazione di centri di coordinamento e di eccellenza, in cui coinvolgere le diverse anime di questa branca della scienza, possibilmente integrando risorse e condividendo strutture. La dimensione europea sembra essere poi una delle vie di uscita, sia per i riferimenti normativi che per le possibilità di confronto e di finanziamento. Infine, per quanto riguarda gli aspetti tecnico scientifici, è significativo il fatto che si senta la necessità di affrontare ciò che precede le analisi o ciò che ne elabora e convalida il risultato: la scelta e la validazione di diversi set di batterie, la preparazione del campione, il giudizio e l'interpretazione ed infine i vari aspetti inerenti l'accreditamento.

Dall'analisi SWOT e dal modo in cui sono stati ordinati i dati è possibile evidenziare meglio le priorità emerse nei Focus Group, utili per una Road Map dell'ecotossicologia. Facendo un ulteriore sforzo di sintesi mettiamo in evidenza macro-insiemi e connessioni che si intersecano con il livello di condivisione evidenziato dai codici colore, identificativi delle diverse categorie di stakeholder. Il risultato viene evidenziato nella grafica riportata di seguito.

Il campione rappresentativo di stakeholder ritiene di trovare al suo interno la potenzialità di creare supporti per una forte condivisione ed integrazione dei saperi e delle esperienze: circuiti, centri, piattaforme on line, attività di aggiornamento, riconoscimenti dai decisori. Questo fa da giusto contraltare alla carenza di circolazione dell'informazione, ribadita a più voci, alla necessità di riorganizzazione interna di enti ed istituti di ricerca ed alla mancanza di inclusione dell'esperienza maturata nei laboratori privati.

L'aspetto di condivisione e confronto si rivaluta poi con le opportunità che ci offre l'Europa di standardizzazione ed aggiornamento, nonché di finanziamento. Opportunità che è possibile cogliere solo attraverso le azioni di un network rappresentativo e con il riconoscimento di un ente come ISPRA e di istituzioni ad esso collegate, nel rapporto con il legislatore istituzionale.

La scarsa chiarezza nelle norme, la burocrazia e la loro mancanza di aggiornamento, sia in termini di modalità tecniche di esecuzione che di novità concettuali, sono visti come la principale minaccia che limita il riconoscimento del lavoro di un gruppo di esperti a livello istituzionale e quindi impedisce l'utilizzo dell'ecotossicologia a larga scala. Uno dei punti nodali della Road Map, per avere prospettive future, è dunque quello di risolvere positivamente questo aspetto.

Un'altra opportunità riconosciuta è quella dell'accreditamento che al momento però è percepita ricca di ostacoli difficili da superare. Il vantaggio di una standardizzazione riconosciuta si scontra con l'elevato costo, l'attuale inadeguatezza a questo tipo di analisi ed i pochi gradi di libertà concessi al miglioramento costante compiuto da chi a ricerca in questo campo.

Le ultime indicazioni utili alla pianificazione di una serie di percorsi paralleli all'interno di una Road Map per la crescita del settore dell'indagine biologica in ecotossicologia sono quelle più tecniche. È evidente dall'osservazione dei punti focali derivati dalla SWOT analisi che la mancanza di omogeneità nei protocolli e nell'interpretazione, viene risolta dalla volontà del gruppo di aumentare gli interconfronti, allargandoli a tutti gli attori che si possono coinvolgere, nonché di produrre linee guida e allegati tecnici. L'intento è poi che questi ultimi siano aggiornati di pari passo con le scoperte scientifiche al fine di essere recepiti in modo privilegiato e rapido nel contesto legislativo, facilitando così l'azione di semplificazione normativa indispensabile per tutti gli aspetti applicativi dell'ecotossicologia.

L'ultima elaborazione dei dati, quella con una traduzione in positivo di ogni elemento, ha permesso di elencare solo obiettivi ed opportunità ed di ridefinire le famiglie



concettuali, modificando leggermente le definizioni espresse nella prima restituzione dei contributi.

Questa visione risulta particolarmente interessante proprio perché ciò che è stato detto ai Focus Group era l'espressione della percezione di un campione altamente rappresentativo dell'expertise in eco tossicologia sull'intero territorio nazionale. Invitiamo comunque a rileggere attentamente i vari contributi elencati nelle pagine precedenti al fine di cogliere una serie di sfumature e dettagli altrimenti non riportati nella descrizione che segue, necessariamente sintetica.

Nel breve periodo vengono messe in evidenza due macroaree di intervento.

La prima è quella che mette in luce la necessità di fare networking, con una maggior circolazione di informazioni ed il supporto digitale per lo scambio ed il confronto. In particolare si sottolinea la volontà di allargare il confronto e di creare una sorta di filiera dell'esperienza capace di aggiornarsi molto velocemente, anche raccordandosi con altri network di dimensione europea, solida a tal punto da essere riconosciuta a livello normativo. L'ipotesi è che queste iniziative possano essere attuate grazie al sufficiente livello di autonomia dimostrato dal vasto gruppo di rappresentanti per l'ecotossicologia presenti alle Giornate di Studio. Le forze in campo per un networking sufficiente ci sono, ma al contempo viene sottolineata la necessità di riorganizzazione interna, di dialogo, di complementarità e non di sovrapposizione o conflitto all'interno delle stesse organizzazioni (enti ed istituti di ricerca) e tra realtà private simili tra di loro ma spesso ignare l'uno dell'altro. Il follow up di questa consapevolezza è già in atto, con l'aumento di riconoscimento nei Gruppi ad Hoc gestiti da ISPRA, con la nascita spontanea di Gruppi per il lavoro su settori specifici (ad es. nano e micro inquinanti), con l'inizio di una organizzazione tra realtà private (Gruppo Informale di Lavoro ad Hoc su H14 - approccio eco tossicologico).

Collegata e parallela è la seconda macroarea e riguarda la capacità di migliorare gli interconfronti e la standardizzazione dei protocolli, in particolare allargando i contributi ad esperienze e "customerizzazioni" in atto per rendere l'applicazione del *bioassay* più omogenea, più aggiornabile, più scientifica, meno banalizzata nell'eccesso di semplificazione o standardizzazione e quindi più efficace. In questo lavoro metodologico appare opportuna la creazione di centri di coordinamento, anche forse in forma diffusa, che coordinino in modo uniforme l'aggiornamento normativo ed il trasferimento al legislatore.

Proprio l'aspetto normativo, assieme all'accreditamento, raccolgono le ultime opportunità di breve periodo: risulta prioritario il supporto degli enti di riferimento ed il loro coordinamento in un percorso di omologazione che possa facilitare l'adozione dell'ecotossicologia da parte degli attori economici del territorio.

Nel lungo periodo le rilevanze si invertono e gli obiettivi e opportunità per il networking si riducono, tranne per quegli aspetti che richiedono una gestazione più lunga, come ad esempio il reperimento di fondi europei.

Si mantiene invece rappresentativa la macroarea di intervento inerente gli interconfronti ed i protocolli analitici, ma con una logica differenziazione nel lungo periodo: l'attenzione si pone sul giudizio integrato, su aspetti specifici come il destino dei campioni o la codifica H14, sulla comparazione tra batterie, anche nella logica di una progressiva semplificazione normativa. Per i centri di coordinamento o standardizzazione, connessi alle attività di interconfronto, rimangono nel lungo periodo solo quegli obiettivi che richiedono investimenti e maggior tempo per essere

realizzati, come ad esempio l'uso condiviso di strumenti all'avanguardia o la produzione di specie test.

L'ultima macroarea di intervento che consideriamo è quella che unisce le norme con l'accreditamento, dove va sottolineato che nel lungo periodo compaiono quasi esclusivamente opportunità indirette, ovvero azioni per contrastare le minacce esterne al mondo degli esperti in materia. La percezione che gli ecotossicologi hanno è dunque quella dell'esistenza di una serie di ostacoli che impediscono l'applicazione di un approccio analitico su base biologica. Difficoltà a recepire indicazioni ed aggiornamenti scientifici dall'apparato legislativo, complicazioni burocratiche che rallentano l'iter applicativo, inadeguatezza delle procedure di accreditamento sono i principali limiti che si vorrebbero superare.

In conclusione riteniamo dunque che sia possibile definire una Road Map di prospettive future, intesa come una serie di percorsi paralleli, che prendono spunto da tutte le indicazioni di queste ultime pagine del Position Paper e che devono essere portate avanti con modalità fondate sulle buone pratiche di partecipazione. Riteniamo sia indispensabile dare una concreta opportunità di crescita al settore dell'indagine biologica in ecotossicologia (*bioassay*), strumento indispensabile per la valutazione degli effetti dello sviluppo antropico, ai fini di una gestione sostenibile del territorio e della tutela del capitale naturale nazionale.

## ALLEGATO: CONTRIBUTI DEI FOCUS GROUP

CLUSTER	DESCRIZIONE	CRITICITA' IMPORTANTE	ASPETTO PRIORITARIO	SOLUZIONE IPOTIZZATA	ENTE	RICERCA	PRIVATO
NORME: A-SPETTI TECNICI E INTERPRETAZIONE	necessità di chiarezza normativa: norme "dinamiche" che diano indicazioni applicabili e aggiornate, ovvero gli allegati tecnici non devono rientrare nelle leggi e possono essere aggiornate (es Linee Guida di ISPRA)		1		1	1	1
NORME: A-SPETTI TECNICI E INTERPRETAZIONE	batterie test non previste nelle leggi	1			1		1
NORME: A-SPETTI TECNICI E INTERPRETAZIONE	giudizio intergrato delle batterie test per uniformare i report	1			1		1
NORME: A-SPETTI TECNICI E INTERPRETAZIONE	normative eterogenee e difficoltà interpretative (es H14)	1			1	1	1
NORME: A-SPETTI TECNICI E INTERPRETAZIONE	poca chiarezza legislazione italiana che determina la difficoltà a proporre saggi biologici e quindi scarsa richiesta dei test	1			1		1
CHIAREZZA LEGISLATIVA	carenza di formazione degli operatori al variare della normativa	1			1	1	
CHIAREZZA LEGISLATIVA	carenza e lacunosità della normativa	1			1	1	
CHIAREZZA LEGISLATIVA	legislazione carente e quindi difficoltà a interpretarla e rapportarla al l'utente finale	1					1
CHIAREZZA LEGISLATIVA	normativa molto in ritardo	1			1	1	
BUROCRAZIA	burocrazia mangiatempo	1			1	1	1
BUROCRAZIA	burocrazia lontana dalla ricerca	1			1	1	1
BUROCRAZIA	eccesso di burocrazia (es accreditamento)	1				1	
ORGANIZZAZIONE E GESTIONE	scarsa organizzazione interna a enti	1			1		
ORGANIZZAZIONE E	poco personale negli enti	1			1		

GESTIONE							
ORGANIZZAZIONE E GESTIONE	creare centri di eccellenza (strumenti)		1		1		
ORGANIZZAZIONE E GESTIONE	creare centri di riferimento (con reperibilità, ma distribuzione di impegni)		1		1		
ORGANIZZAZIONE E GESTIONE	manca di indirizzo / confronto interni all'ente	1			1		
ORGANIZZAZIONE E GESTIONE	sovrapposizione di competenze tra enti diversi	1				1	
ORGANIZZAZIONE E GESTIONE	normativa troppo tecnica a freno, normativa poco flessibile non adeguata al progresso scientifico		1		1	1	1
STRATEGIE	integrazione delle risorse		1		1	1	1
STRATEGIE	non c'è tempo per la ricerca e la standardizzazione di protocolli	1			1	1	
STRATEGIE	critica la programmazione delle attività: solo obiettivi economici (tagli) ma non strategie	1			1		
NTO ACCREDITAME	poca chiarezza legislativa rispetto al sistema qualità - accreditamento	1			1	1	1
NTO ACCREDITAME	percorso qualità secondo ACCREDIA		1				1
NTO ACCREDITAME	poca preparazione auditor su qualità in ecotossicologia	1			1		1
NTO ACCREDITAME	costi accreditamento	1			1		1
NTO ACCREDITAME	eccessiva specializzazione dei laboratori in ambito ARPA e pubblico in genere, dovuto anche alla necessità di accreditamento	1			1	1	1
NTO ACCREDITAME	assenza di supporto di fronte ai vincoli degli adempimenti normativi per l'accreditamento	1			1		
NTO ACCREDITAME	costi vs. inadeguatezza sistema di qualità	1					1
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	poca informazione su intercalibrazioni	1					1
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE	manca di circolazione dell'informazione in generale	1			1	1	1

INFORMAZIONI							
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	mancanza di circolazione dell'informazione nel pubblico (es interazione Ministero-ISPRA-Agenzie)	1			1	1	1
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	mancanza di comunicazione e confronto, anche all'interno di una categoria di stakeholder	1			1	1	1
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	integrazione pubblico - privato		1		1	1	1
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	mancata influenza sul legislatore	1				1	
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	mancata interazione con i privati	1				1	
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	mancata circolazione delle informazioni	1				1	
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	ricerca è scollegata dalle esigenze dei privati e degli organismi di controllo	1				1	
INTEGRAZIONE E CIRCOLAZIONE INFORMAZIONI	non esistono programmi di ricerca congiunti (in campo ecotossicologico)	1				1	
RAPPORTO CON GLI STAKEHOLDER	accorciare le distanze tra ricerca e legislazione / tra privato e legislazione		1		1	1	1
BATTERIE ED INTERCONFRONTO	maggior coinvolgimento dei privati nei progetti di interconfronto		1				1
BATTERIE ED INTERCONFRONTO	standardizzazione metodiche		1		1		
BATTERIE ED INTERCONFRONTO	poca sperimentazione e batterie statiche		1		1		
BATTERIE ED INTERCONFRONTO	sviluppo e validazione protocolli con organizzazioni interconfronti	1			1	1	1
BATTERIE ED INTERCONFRONTO	necessità di protocolli standardizzati, condivisi e al passo con i tempi (es protocolli ISPRA)		1		1	1	1
BATTERIE ED	identificazione organismi bersaglio	1				1	

INTERCONFRONTO							
BATTERIE ED INTERCONFRONTO	organizzazione di circuiti di intercalibrazione con finanziamenti e coordinamento centrale		1		1	1	1
BATTERIE ED INTERCONFRONTO	batterie confrontabili		1		1	1	1
GIUDIZIO ED INTERPRETAZIONE	manca di criteri di giudizio	1			1	1	1
GIUDIZIO ED INTERPRETAZIONE	classificazione dei rifiuti che ricadono nel cod H14 soprattutto per la scelta della batteria	1			1		1
GIUDIZIO ED INTERPRETAZIONE	assenza di accordo su procedure tra ISPRA e Sistema Agenzie	1			1	1	1
A PREPARATIV	metodologie per preparativa più semplici e definite		1				1
A PREPARATIV	preparazione del campione diversa per destinazione d'uso del materiale o del rifiuto	1			1		1
A PREPARATIV	manca di un protocollo uniforme per preparazione di un campione per il test di lisciviazione (difficoltà nella preparazione, destino del campione)	1					1
<b>SOLUZIONI:</b> LINEE GUIDA	semplificazione normativa in appoggio alle linee guida				1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> DIMENSIONE EUROPEA	networking europeo per aggiornamento norme				1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> DIMENSIONE EUROPEA	utilizzare organismi già validi in sede Europea				1		1
<b>SOLUZIONI:</b> DIMENSIONE EUROPEA	va bene tutto ma dove trovare i finanziamenti ?				1		1
<b>SOLUZIONI:</b> DIMENSIONE EUROPEA	bese credibile dal punto di vista economico- applicativo considerata a livello Europeo attraverso momenti di incontro tra enti ricerca, agenzie e settore privato				1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> CENTRI COORDINAMENTO	centri di coordinamento come organismi che indirizzano sul piano metodologico e strumentale				1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> CENTRI COORDINAMENTO	centri di riferimento per protocolli				1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b>							

CENTRI COORDINAMENTO	centri di riferimento per produzione specie test			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> CENTRI COORDINAMENTO	centri di riferimento per l'organizzazione di interconfronti			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORKING (MODI E DIMENSIONI)	network di laboratori specializzati (confronto tra esperti)			1	1	1	
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORKING (MODI E DIMENSIONI)	definire e valorizzare mandato ISPRA come organo tecnico del Ministero dell'Ambiente (non solo ICRAM + APAT)			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORKING (MODI E DIMENSIONI)	tavolo permanente pubblico - privato per la raccolta delle criticità e trasferimento sul piano normativo con interazione tra Ministeri diversi			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORKING (MODI E DIMENSIONI)	tavolo permanente pubblico - privato per la raccolta delle criticità			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORKING (MODI E DIMENSIONI)	possibile network in SETAC con coinvolgimento tutti stakeholder (in Italia è poco rappresentata e solo accademica), ma anche legislatore			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORK DIGITALE	sito collegato alle giornate di studio, anche in streaming			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORK DIGITALE	piattaforma network on line con Blog			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORK DIGITALE	piattaforma network dove confronto e sistemizzazione delle esperienze in campo ecotossicologico			1	1	1	1
<b>SOLUZIONI:</b> NETWORK DIGITALE	creare indirizzo #EcoToxLab			1			1

# FIORITURE DELLA MICROALGA POTENZIALMENTE TOSSICA *OSTREOPSIS OVATA* LUNGO LE COSTE ITALIANE DALL'EMERGENZA DEL 2005 AD OGGI: MONITORAGGIO E GESTIONE.

di P. Borrello<sup>a</sup>, R. De Angelis<sup>a</sup>, E. Spada<sup>a</sup>

a ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale via Vitaliano  
Brancati 48, 00144 Roma – patrizia.borrello@isprambiente.it;  
roberta.deangelis@isprambiente.it; emanuela.spada@isprambiente.it

---

**Abstract** - *Ostreopsis cf. ovata* è una microalga bentonica potenzialmente tossica, che cresce su macroalghe e substrati duri e durante le fioriture si diffonde in colonna d'acqua. E' presente in vari paesi del Mar Mediterraneo. La prima segnalazione in Italia risale al 1989, lungo le coste laziali; ad oggi si rileva nella maggior parte delle regioni costiere italiane eccetto che e in Italia manca in Veneto, Emilia Romagna e Molise. Le fioriture di questa microalga possono dare luogo a fenomeni di intossicazione umana per inalazione o per contatto con composti palitossina-simili prodotti dalla microalga presenti nell'aerosol marino o disciolti nell'acqua (225 casi a Genova nel 2005). Effetti tossici sono stati osservati anche su organismi marini bentonici (stati di sofferenza o mortalità). La presenza di *Ostreopsis cf. ovata* è soggetta ad attività di sorveglianza attraverso programmi di monitoraggio nazionali e regionali prevalentemente eseguiti dalle Agenzie regionali (ARPA). Tali attività hanno chiarito la distribuzione e l'andamento delle fioriture. In questo studio viene illustrato l'andamento delle fioriture e la loro gestione sulla base dei dati di monitoraggio raccolti dal 2006 ad oggi. In generale dal 2006 al 2013 si assiste ad una crescente estensione spaziale e temporale della presenza, con differenti picchi di fioritura tra le aree monitorate. Le norme tecniche che disciplinano la gestione del rischio di esposizione sono contenute nel DM 30 marzo 2010, mentre per le metodologie di campionamento e di analisi si fa riferimento ai protocolli operativi ISPRA.

Keywords: *Ostreopsis ovata*, fioriture, monitoraggio, impatti, gestione

## Introduzione

*Ostreopsis cf. ovata* è una microalga marina bentonica potenzialmente tossica rinvenuta negli ultimi anni in molte aeree del Mar Mediterraneo incluse le acque marino costiere italiane. Fino a circa 15 anni fa, le specie del genere *Ostreopsis* (n. 9 specie) erano normalmente rinvenute in aree tropicali e subtropicali; successivamente *O. cf. ovata* e *O. cf. siamensis* sono state segnalate anche in aree temperate come la Nuova Zelanda, il Mar Mediterraneo e le coste giapponesi<sup>1,2,3</sup>. *Ostreopsis cf. ovata* è la specie più diffusa in Mediterraneo in grado di produrre

potenti tossine (ovatossine, palitossina in tracce) diffuse sia nell'aerosol marino che in colonna d'acqua.

Questo microrganismo cresce e si moltiplica su macroalghe, angiosperme o substrati duri (rocce, gusci di invertebrati) in particolare in aree a scarso idrodinamismo (es. baie chiuse), acque poco profonde con temperature generalmente >25°C. Durante le fioriture (proliferazione cellulare) le cellule algali possono essere facilmente risospese in colonna d'acqua per azione del moto ondoso e dare origine a flocculi o schiume superficiali. La prima segnalazione in Italia risale al 1989 lungo le coste laziali (Zingone, com. pers.)<sup>4</sup>; ad oggi, eccetto che in Veneto, Emilia Romagna e Molise<sup>5,6,7,8</sup> *O. cf. ovata* e i suoi blooms (fioriture) vengono rilevati nella stagione estiva nelle restanti regioni costiere. Le fioriture, in alcuni casi sono state associate a fenomeni di intossicazione umana per inalazione o per contatto diretto con le tossine prodotte. Quest'ultima si manifesta con sintomi di natura parainfluenzale: tosse, irritazione delle prime vie aeree, dolori muscolari e articolari, congiuntivite, rinorrea e febbre e si risolve spontaneamente nelle 24-72 ore successive. In particolare, nel luglio 2005 a Genova si registrarono n. 225 casi di una sindrome febbrile-respiratoria in persone che avevano frequentato le spiagge e il litorale di Genova in concomitanza di una abbondante fioritura di *Ostreopsis cf. ovata* lungo il tratto di costa interessato<sup>9,10</sup>. La contemporaneità degli eventi portò ad ipotizzare che la sintomatologia potesse essere attribuita all'inalazione di aerosol marino contenente tossine o frammenti di cellule di *Ostreopsis cf. ovata*. Infatti nei campioni analizzati furono trovate tossine identificate successivamente come ovatossine-a<sup>11</sup>. Effetti tossici, stati di sofferenza o mortalità, sono stati osservati negli anni anche su organismi marini bentonici quali mitili, ricci, stelle marine e macroalghe.

Dal 2006, sia per le problematiche ambientali, sia per quelle sanitarie, la presenza di *Ostreopsis cf. ovata* è stata soggetta ad attività di sorveglianza attraverso programmi di monitoraggio nazionali e regionali prevalentemente eseguiti dalle Agenzie regionali (ARPA); inoltre sono stati effettuati anche programmi di ricerca sulla biologia, fisiologia, chimica ed ecologia, per una maggiore conoscenza della dinamica dell'alga. Tutte queste attività hanno chiarito la distribuzione e l'andamento delle fioriture

In questo contesto ISPRA a partire dal 2006, a seguito della Direttiva Programma Alghe Tossiche del Ministro dell'Ambiente (n. GAB/2006/6741/BO1), ha attivato con le ARPA costiere la linea di lavoro "Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane" al fine di individuare elementi per una strategia comune nazionale di campionamento, analisi, monitoraggio, sorveglianza, informazione, comunicazione e gestione del fenomeno "alga tossiche". Molte attività sono state svolte nell'ambito di tale coordinamento quali raccolta dati, seminari, corsi di formazione per gli operatori delle ARPA, i "Protocolli operativi" nel 2007 in cui sono riportate le metodologie di campionamento e analisi, piano di monitoraggio e gestione, da applicarsi nelle attività di controllo a livello nazionale che a loro volta sono state adottate nei programmi nazionali di monitoraggio. I dati di abbondanza e dei fattori ambientali al contorno sono l'oggetto del progetto Reti Neurali *Ostreopsis* Re.N.O. (ISPRA), al fine di comprendere meglio le relazioni che portano allo sviluppo dei blooms algali. Inoltre è stata creato un network dedicato sul sito ISPRA per lo scambio di informazioni e la raccolta dei dati di monitoraggio tra i soggetti coinvolti.

## **Materiali e metodi**

Sono stati utilizzati i dati del monitoraggio nazionale [979/82], raccolti nella banca dati del MATTM (Si.Di.Mar.; <http://www.minambiente.it>) per il 2009 e quelli raccolti da ISPRA nell'ambito della Direttiva Programma Algae Tossiche del Ministro dell'Ambiente (n. GAB/2006/6741/B01) forniti dalle ARPA costiere dal 2006 al 2013. Inoltre sono state utilizzate informazioni provenienti dagli Istituti scientifici e dalle Università per gli anni citati. La presenza della microalga è stata valutata nei campioni di acqua e macroalghe e sono stati considerati positivi, i siti in cui la microalga era presente almeno una volta nelle due matrici nel periodo di monitoraggio; inoltre, per ogni sito, è stato valutato il superamento, almeno una volta, del valore di riferimento (D.M. 30/3/2010) di 10000 cell/l. In aggiunta sono state analizzate tutte le azioni portate avanti nel tempo a livello nazionale dalle Istituzioni per la gestione e la conoscenza del fenomeno.

## **Risultati**

**Andamento** - La tabella e le figure seguenti mostrano l'andamento spaziale e temporale delle aree interessate dalla presenza e dalle fioriture di *Ostreopsis* cf. *ovata*. L'elaborazione dei dati ha permesso di valutare eventuali impatti delle fioriture, sul comparto acqua, sugli organismi bentonici, sulla salute umana e le relative misure di gestione. (Tab.1)

A partire dal 2006 e fino al 2011 le aree interessate dalla presenza e dai blooms sono aumentate (trend positivo) con un incremento dal 39,06% al 56,73%. Tale dato cala nel 2012 al 55,70% e ancor di più nel 2013 con il 53,54% (Tab.1 e Fig.1) senza un apparente mutamento delle condizioni al contorno.

Le concentrazioni di *Ostreopsis* sono state molto variabili in relazione alle condizioni meteo-marine. Per quanto riguarda il superamento del valore soglia le percentuali sembrano non seguire un trend; il dato più interessante riguarda il 2008, in cui oltre il 50% dei siti positivi per la matrice acqua, supera il valore soglia (Tab. 1).

Stati di sofferenza o morte sono stati osservati su ricci, stelle marine, patelle, mitili e macroalghe; sono stati segnalati casi di intossicazione umana in Abruzzo, Puglia, Marche e Sicilia e interdetta la balneazione e/o l'accesso alle spiagge (Marche) come misura cautelativa. Inoltre è stata impedita la raccolta di organismi marini eduli (Campania) anche se ad oggi non sono stati segnalati casi di intossicazione alimentare.

**Gestione: Monitoraggio, misure e altre attività** - Il monitoraggio di *Ostreopsis* cf. *ovata* e altre microalghe bentoniche potenzialmente tossiche, prevalentemente eseguito dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), viene effettuato nell'ambito di alcuni regolamenti regionali e nazionali [L. 979 dicembre 1982, Disposizioni per la difesa del mare (2008-2009) MATTM; D.Lgs. 116 e DM 30 Marzo 2010, per la gestione della qualità delle acque di balneazione]. Il monitoraggio viene effettuato secondo i criteri contenuti nelle Linee guida del Ministero della Salute

(All. C DM 30 marzo 2010) in corso di aggiornamento, a cui partecipa anche ISPRA. Il piano di sorveglianza prevede tre livelli di indagine, sulla base delle abbondanze cellulari registrate: **Routine, Allerta, Emergenza.**

Il valore di abbondanza di **10000 cell/l** è stato assunto come soglia di riferimento e il suo superamento, associato a condizioni meteo-marine favorevoli al mantenimento della fioritura e alla formazione di bioaerosol, determina l'adozione di una serie di azioni che comprendono:

- l'intensificazione del monitoraggio;
- l'osservazione dello stato di salute degli organismi bentonici anche di interesse commerciale;
- l'informazione delle autorità competenti (Regione, ASL, Sindaci) e dei cittadini.

Il **divieto di balneazione** con conseguente chiusura della spiaggia, attualmente è l'unica misura di gestione adottata dall'autorità competente a tutela della salute dei bagnanti.

Le metodologie per il campionamento e le analisi delle densità cellulari sono contenute nel documento ISPRA: **"Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis* spp.: Protocolli Operativi"** (Quaderni ISPRA, 5/2012, [www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)). La **diffusione dei dati** di monitoraggio e **l'informazione al cittadino** avvengono attraverso i siti web istituzionali delle ARPA e delle Regioni (bollettini e relazioni), del Ministero della Salute (Portale Acque - Profili ambientali delle acque di balneazione) e di ISPRA (Rapporti, Annuario dei dati ambientali).

Sulla base dell'esperienza e delle conoscenze acquisite, ISPRA partecipa al progetto M3-HABS "Risk Monitoring, Modeling and Mitigation of Harmful Algal Blooms along Benthic Mediterranean Coasts" (2014-2015) finanziato dal Programma ENPI-CBCMED e al GdL GIZC-*Ostreopsis ovata* nell'ambito dell' Accordo RAMOGE (Francia-Italia-Principato di Monaco); queste attività hanno lo scopo di giungere a strategie di monitoraggio e gestione comuni e condivise a livello mediterraneo.

I dati raccolti da ISPRA sono stati anche utilizzati per la Valutazione Iniziale come richiesto dalla CEE per la Direttiva quadro sulla Strategia Marina 2008/56/CE - MSFD - D.Lgs. 13 Ottobre 2010.

Infine ha coordinato il Programma di ricerca "*Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis* spp.: nuovi rischi di tossicità microalgale nei mari italiani" (2008-2010) finanziato dal MATTM, nato dall'esigenza di colmare alcune delle numerose lacune conoscitive.

## **Conclusioni**

Dal 1989, data della prima segnalazione, si è verificato un incremento nella distribuzione spaziale e temporale della presenza di *O. cf. ovata*, dovuto anche alle maggiori conoscenze ed esperienze scaturite da specifiche attività di controllo. Il monitoraggio di queste alghe, inizialmente inserito in alcuni piani regionali di indagine è divenuto di routine dagli anni 2009 (L. 979/82) e 2010 (D.lgs. 116/08 e DM 30/3/2010) per le 15 regioni costiere. Ad oggi la microalga è stata riscontrata nelle acque di 12 regioni costiere e mai in Veneto, Emilia Romagna e Molise. In seguito agli episodi del 2005 si assiste ad una progressiva estensione delle rilevazioni che mostrano un trend positivo fino al 2011 con una lieve inflessione per gli anni

2012 e 2013. Tale dato potrebbe far pensare ad una regressione del fenomeno anche se due anni sono troppo pochi per stabilire che si tratti di una inversione di tendenza. Sono state osservate differenze temporali nel picco della fioritura tra l'area tirrenica-ionica e l'area Adriatica: in generale nella prima le maggiori abbondanze si osservano tra fine luglio-agosto con temperature di 24-26°C e sporadici picchi rilevati ad ottobre in Campania<sup>5,6,7,8</sup>; nell'Adriatico meridionale le massime concentrazioni si registrano tra agosto e settembre<sup>5,6,7,8</sup>, mentre nell'Adriatico settentrionale tipicamente tra settembre e ottobre, quando i valori di temperatura sono anche inferiori a 20°C<sup>5,6,7,8,12</sup>. Diversi studi considerano l'idrodinamismo, insieme alla temperatura, come uno dei principali fattori che influenzano l'andamento delle fioriture. Siti protetti rocciosi e poco profondi, presentano tipicamente abbondanze più elevate rispetto a siti esposti al moto ondoso<sup>5,6,7,8,12</sup>. Infatti le abbondanze delle dinofitocoe bentoniche, sono particolarmente influenzate dall'azione delle onde, in quanto queste microalghe, a differenza delle diatomee, sono solo debolmente associate con il substrato e possono essere facilmente risospese in colonna d'acqua.

Nel mare Adriatico sono state individuate due aree, una nelle Marche (Ancona-Passetto)<sup>5,6,7,8,12,13,14</sup> e una in Puglia (a nord di Bari)<sup>5,6,7,8,15</sup>, interessate ogni anno, in estate, da fioriture intense (fino a milioni di cellule per litro e/o per grammo di macroalga) e ricorrenti tanto da essere identificate come aree 'hot spot'. Nell'arco temporale considerato i blooms hanno causato effetti nocivi sugli organismi marini e sono state segnalate sindromi simil-influenzali in concomitanza delle fioriture algali in varie regioni costiere. Alcuni comuni per prevenire i rischi di esposizione hanno interdetto la balneazione e/o l'accesso alle spiagge.

In questi ultimi anni molte lacune conoscitive su *D. cf. ovata* sono state colmate tuttavia, diversi aspetti restano ancora da chiarire per prevedere e mitigare i possibili effetti sugli ecosistemi costieri e sulla salute umana. Ad esempio non è chiara l'interazione tra i fattori ambientali che determinano l'innescò della fioritura; inoltre non sono disponibili dati che mettono in relazione l'esposizione con il grado di intossicazione. Per quanto riguarda l'impatto di *Ostreopsis* spp. e altre microalghe potenzialmente tossiche, sull'ambiente marino (habitat e biota) al momento sono reperibili informazioni discontinue e insufficienti per poter definire un valore soglia e/o intervalli di valori ed effettuare una valutazione dello stato. Infine, mancano dati e studi utili ad identificare attività antropiche eventualmente responsabili della presenza e sviluppo di questa microalga potenzialmente tossica. Queste lacune potrebbero essere superate a condizione che vengano effettuati monitoraggi e studi specifici.

### ***Ringraziamenti***

Gli autori desiderano ringraziare Irene Di Girolamo del MATTM; Raffaele Proietti di ISPRA per l'elaborazione grafica delle mappe; tutti i colleghi delle ARPA/ARTA: Abruzzo, Basilicata, Calabria, Campania, Emilia-Romagna, Friuli Venezia-Giulia, Lazio, Liguria, Marche, Molise, Puglia, Sardegna, Sicilia, Toscana, Veneto che in questi anni hanno effettuato il monitoraggio e prodotto i rapporti confluiti nei Rapporti ISPRA.

## Bibliografia

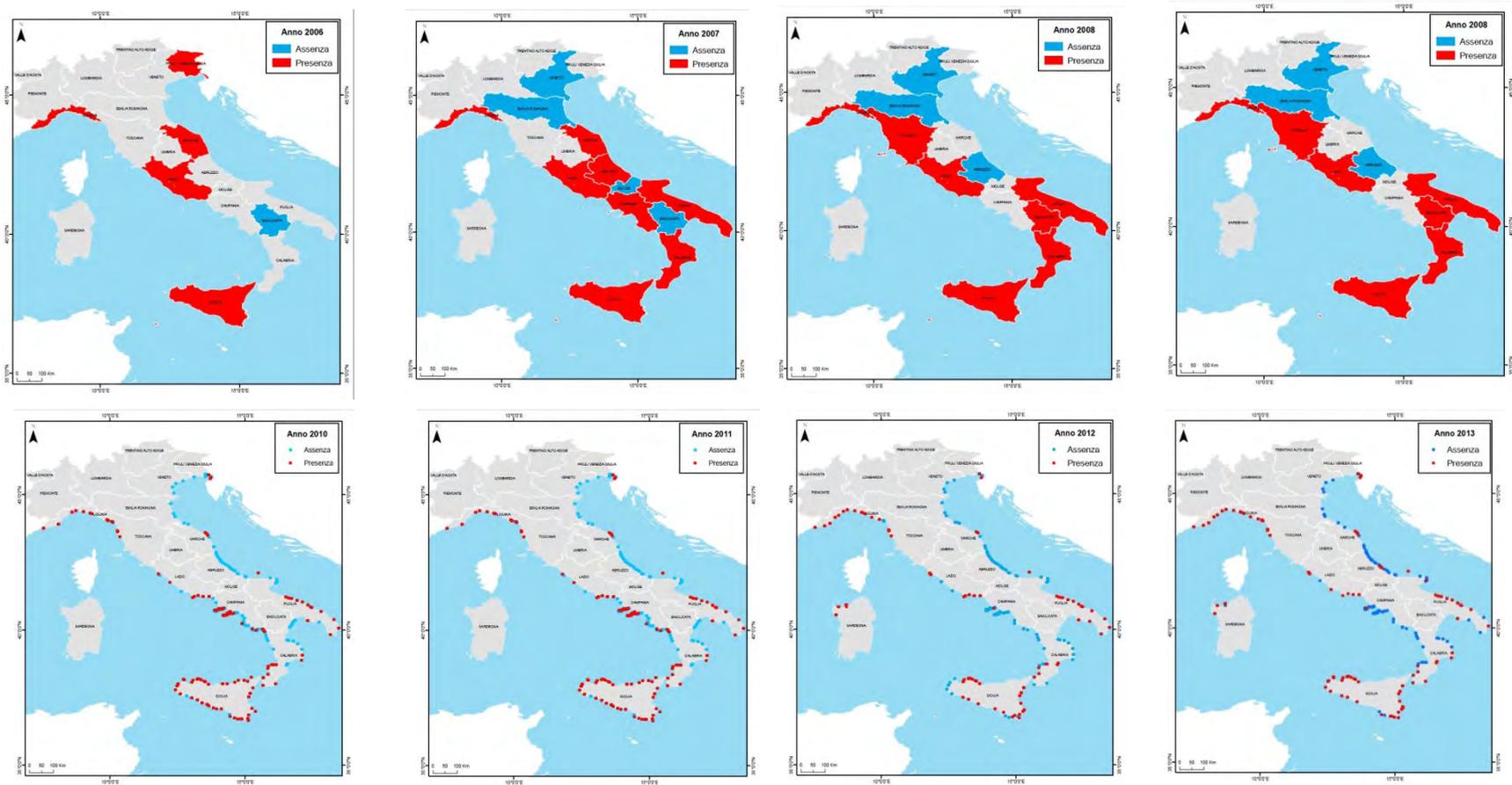
1 Vila M, Garcés E, Masò M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellates assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 26: 51–60; 2 Shears N.T., Ross P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*: an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 8: 916–925; 3 Sato S., Nishimura T., Uehara K., Sakanari H., Tawong W., Hariganeya N., Smith K., Rhodes L., Yasumoto T., Yaira Y., Suda S., Yamaguchi H., Adachi M. 2011. Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific Coast, with Special Reference to a Novel Clade from Japan. *PLoS ONE*. 6 (12): e27983; 4 Tognetto, L., Bellato, S., Moro, I., Andreoli, C., 1995. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (*Dinophyceae*) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Botanica Marina* 38, 291–295; 5 ISPRA, Rapporto n. 127, 2010 - Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009. [www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it); 6 ISPRA, Rapporto n. 148, 2011 - Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino-costiere italiane. Anno 2010. [www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it); 7 ISPRA, Rapporto n. 173, 2012 - *Ostreopsis* cf. *ovata* lungo le coste italiane: monitoraggio 2011. [www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it); 8 ISPRA, Rapporto n. 188, 2013 - Monitoraggio e sorveglianza delle fioriture di *Ostreopsis* cf. *ovata* lungo le coste italiane – Anno 2012. [www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it); 9 Brescianini C., Grillo, C., Melchiorre, N., Bertolotto, R., Ferrari, A., Vivaldi, B., Icardi, G., Gramaccioni, L., Funari, E., Scardala, S., 2006. *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *EuroSurveill.* 11: E060907.3; 10 Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., Gasparini, R., Icardi, G., 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two year syndromic surveillance, 2005-2006, in northwest Italy. *Euro Surveill.* 12: E070607.1; 11 Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-A in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 19: 111-120; 12 Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera [northern Adriatic Sea]: Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233-239; 13 Accoroni S., Romagnoli T., Colombo F., Pennesi C., Di Camillo C.G., Marini M., Battocchi C., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Tartaglione L., Penna A., Totti C., 2011. *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar. Poll. Bull.*, 62: 2512-2519; 14 Accoroni S, Colombo F., Pichierrì S., Romagnoli T., Marini M., Battocchi C., Penna A., Totti C., 2012b. Ecology of *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea. *Cryptogamie, Algologie*, 33 (2): 191-198; 15 Ungaro N., Assennato G., Blonda M., Cudillo B., Petruzzelli R., Mariani M., Pastorelli A.M., Aliquò M.R., D'angela A., Aiello C., Ranieri S., 2010. Occurrence of the potentially toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* along the apulian coastal areas (Southern Italy) and relationship with anthropogenic pollution. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (9): 1813-1821.

Tabella 1: Presenza e trend di *Ostreopsis cf. ovata* nelle acque costiere italiane dal 2006 al 2013.

Anno	Numero di regioni monitorate	N. Siti	Siti positivi	% dei siti positivi	Siti con abbondanze $\geq 10000$ cell/L	% Siti con abbondanze $\geq 10000$ cell/L	Conc. max (cell/L)	Segnalazioni sugli organismi bentonici	Segnalazioni effetti tossici sull'uomo	Divieto raccolta e vendita organismi marini	Misure a tutela della salute umana
2006*	6										
2007	12	384	150	39,06	23	32,86	641.136 (Marche)	Puglia: macroalghe	Puglia	NO	NO
2008	12	444	178	39,91	74	52,9	5.000.000 (Marche-Puglia)	Marche: bivalvi, Toscana: ricci, patelle, macroalghe	Marche, Puglia	Marche Puglia Campania	Marche, Puglia, Toscana, Liguria
2009	15	415	161	40,24	44	24,85	7.500.000 (Puglia)	Sardegna : macroalghe, Toscana: macroalghe, ricci, mitili	Marche	NO	Marche, Puglia, Toscana, Liguria
2010	14	325	157	48,31	42	33,33	10.262.000 (Liguria)	NO	NO	Campania	Marche (divieto balneazione e pulizia spiaggia)
2011	14	245	139	56,73	36	30	4.890.564 (Puglia)	Friuli Venezia Giulia: macroalghe, patelle, ricci ; Sardegna:macroalghe Toscana:patelle, ricci	Sicilia, Puglia	Campania	Marche (divieto balneazione)
2012	14	228	127	55,70	38	29,69	1.900.000 (Marche)	Friuli Venezia Giulia:macroalghe, Toscana: patelle, ricci	NO	Campania	Marche (divieto balneazione)
2013	14	226	121	53,54	42	40	1.559.000 (Marche)	Friuli Venezia Giulia:gasteropodi, mitili, patelle)	Puglia, Abruzzo		Marche (divieto balneazione, Comunicazione al cittadino)

\* La quantità di dati per questo anno è limitata, pertanto non sono state possibili effettuare ulteriori elaborazioni

Figura 1: Presenza e trend di *Ostreopsis cf. ovata* nelle acque costiere italiane dal 2006 al 2013.



# L'APPROCCIO ECOTOSSICOLOGICO PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DA *OSTREOPSIS* CF. *OVATA*: STATO DELL'ARTE.

di P. Borrello<sup>a</sup>, E. Spada<sup>a</sup>, R. De Angelis<sup>a</sup>,

<sup>a</sup> ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale via Vitaliano Brancati 48, 00144 Roma – patrizia.borrello@isprambiente.it; emanuela.spada@isprambiente.it, roberta.deangelis@isprambiente.it.

---

**Abstract** - *Ostreopsis* cf. *ovata* è una microalga bentonica potenzialmente tossica, originariamente rilevata in aree tropicali e subtropicali e nell'ultima decade diffusa anche in zone temperate e nel Mar Mediterraneo prevalentemente nella stagione estiva.

Questa microalga può produrre palitossina (PLTX), considerata una delle molecole più tossiche in natura, di cui in zone tropicali sono stati descritti effetti letali sull'uomo. Tuttavia il ceppo Mediterraneo sembra produrre quasi esclusivamente ovatossine (analoghi della PTLX) associate finora sia a casi di intossicazione umana (per inalazione, irritazione o contatto), sia a sofferenze o mortalità di invertebrati bentonici

La continua espansione lungo le coste italiane di *Ostreopsis* cf. *ovata* e le sue massive fioriture, hanno comportato una serie di problematiche ambientali, sanitarie ed economiche tali da istituire un programma di monitoraggio nazionale della microalga. Durante queste attività sono stati descritti effetti tossici principalmente su molluschi, echinodermi e macroalghe in concomitanza dei blooms algali. Ad oggi esiste soltanto una concentrazione di riferimento in acqua che tiene conto del rischio sanitario e non di quello ecologico che sarebbe opportuno considerare.

In questo lavoro, è riportato lo stato dell'arte sull'utilizzo di test di tossicità per valutare gli eventuali effetti tossici di *O.* cf. *ovata* sugli organismi marini.

Gli studi disponibili fino ad oggi, non consentono di identificare le specie chiave più idonee per valutare gli effetti ecologici delle fioriture di *O.* cf. *ovata* tuttavia, emerge che i test di tossicità possono essere uno strumento utile a definire un valore soglia ambientale per determinare il rischio ecologico dei blooms.

**Keywords:** *Ostreopsis*, ecotoxicological assay/test, lethality test, sea urchin bioassay, marine biotoxins.

## **Introduzione**

La presenza del dinoflagellato bentonico del genere *Ostreopsis*, inizialmente descritta nei mari tropicali e sub tropicali è, negli ultimi anni, sempre più frequente anche in aree temperate prevalentemente durante la stagione estiva. In particolare, nel Mar Mediterraneo sono state riscontrate le specie *Ostreopsis* cf. *ovata* e *Ostreopsis* cf. *siamensis*, di cui la prima è la più diffusa e potenzialmente tossica in quanto in grado di produrre ovatossine (OVTX-a,b,-c,-d,-e), analoghi della palitossina, una delle più potenti tossine presenti in natura (Pardes *et al.*, 2011). Le informazioni sul

meccanismo di azione delle ovatossine, a livello biochimico e cellulare, sono ancora poco note, tuttavia molti studi sulle proprietà tossicologiche della palitossina putativa (PLTX) suggeriscono un'azione sulla pompa sodio potassio, con depolarizzazione della membrana cellulare e conseguente compromissione della normale funzionalità. Questo meccanismo è simile a quello recentemente dimostrato per altre tossine algali quali yessotossine e saxitossine coinvolte nella risposta ossidativa, immunitaria e nella stabilità della membrana lisosomiale, alla base di alterazioni biochimiche e cellulari osservate in molti organismi acquatici. A causa di tali proprietà tossicologiche, le fioriture di *Ostreopsis cf. ovata* sono stati associate casi di intossicazione umana e a stati di sofferenze o mortalità di invertebrati marini bentonici o macroalghe. Da un punto di vista ecologico, un ulteriore problema è rappresentato dal bioaccumulo delle tossine lungo la catena alimentare. Per esempio i ricci, in qualità di erbivori, rappresentano una specie chiave nella catena alimentare, pertanto un effetto tossico su di essi potrebbe avere ripercussioni sull'intero ecosistema. Per tali ragioni i blooms di questa microalga rappresentano un fenomeno emergente, oggetto di studi scientifici multidisciplinari. Ad oggi purtroppo sono ancora insufficienti le informazioni su molti aspetti di quest'alga quali ad esempio l'interazione tra i fattori ambientali che determinano l'insorgere della fioritura, il meccanismo di azione ecc. Per tale motivo resta difficoltoso anche intraprendere misure di gestione volte alla tutela della salute umana e dell'ecosistema marino. Sulla base delle informazioni disponibili e in via cautelativa, Il Ministero della Salute ha fissato a 10000 cell/l il valore limite sanitario delle abbondanze di *Ostreopsis cf. ovata* a tutela della salute umana. Invece, da un punto di vista ambientale non ci sono ancora dei valori soglia a garanzia del mantenimento del *buono stato*, soprattutto della comunità bentonica. Pertanto, sarebbe utile, anche attraverso i saggi ecotossicologici, avere un contributo per la definizione di valori soglia ambientali e per determinare il rischio ecologico dei blooms. Per tale finalità, in questo lavoro, è riportato lo stato dell'arte sull'utilizzo di test di tossicità su varie specie chiave per valutare gli eventuali effetti tossici di *O. cf. ovata* sugli organismi marini.

### ***Materiali e metodi***

Per la realizzazione del presente lavoro sono stati consultati articoli estrapolati principalmente dalla banca dati PubMed utilizzando parole chiave quali: *Ostreopsis*, ecotoxicological assay/test, palitoxin, algal blooms, lethality test, *Artemia salina*, sea urchin bioassay, marine biotoxins, risk assessment, *Mytilus galloprovincialis*, biological effects.

### ***Risultati***

La ricerca ha mostrato una scarsa disponibilità bibliografica sull'argomento, evidenziando la necessità di colmare questa lacuna anche in considerazione dell'elevato impatto delle fioriture in ambiente marino ed in ambito sanitario.

In generale, tutti i saggi sono stati eseguiti utilizzando diverse concentrazioni di ceppi algali mantenuti in coltura e/o provenienti da campioni ambientali. Nelle prove sono state utilizzate sia cellule algali tal quali sia sottoposte a diversi trattamenti quali

variazioni della temperatura di crescita, sonicazione ed isolamento dal terreno di crescita.

Nei lavori analizzati sono stati valutati gli effetti della tossicità di *Ostreopsis cf. ovata* in termini di tossicità acuta in microrganismi test e gli effetti a livello cellulare e biochimico. Il valore misurato nei test di tossicità acuta è LC50, che rappresenta la concentrazione letale media che ha causato la morte del 50% degli animali esposti. Gli organismi utilizzati comprendono: *Artemia salina*, *Artemia franciscana*, *Tigropus fulvus* (crostacei); *Amphibalanus amphitrite* (cirripedi); *Dicentrarchus labrax* (stadi giovanili di spigola); *Paracentrotus lividus* (echinodermi); *Dinophilus gyrociliatus* (policheti); *Vibrio fischeri* (batteri). In tabella si riporta una sintesi delle condizioni sperimentali e i risultati (Tab.1).

Tabella 1 - Organismi Test utilizzati e condizioni sperimentali

Micorganismo test	Tipologia di test e condizioni	Risposta	Riferimento bibliografico
<i>Artemia Franciscana</i>	% di mortalità (24h e 48h) a diverse concentrazioni algali. Cellule in coltura	LC50 <sub>48h</sub> 2,06 cell/ml	C.Caroppo <i>et al.</i> (2009)
<i>Tigriopus fulvus</i>	% di mortalità a diverse concentrazioni algali. Cellule in coltura	LC50 <sub>96h</sub> 19,12 cell/ml	C.Caroppo <i>et al.</i> (2009)
<i>Artemia salina</i>	% di mortalità (50h-48h) a 20°C e 25°C trattamento A;B;C;D. Cellule in coltura	A,20°C: 12,43 cell/ml B20°C: 16,56 cell/ml C20°C: n.c. D20°C:1457,97 cell/ml A,25°C: <4 cell/ml B25°C: <4 cell/ml C25°C: n.c. D25°C:1281,57 cell/ml	M. Faimali <i>et al.</i> (2011)
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	% di mortalità (50h-48h) a 20°C e 25°C trattamento A;B;C;D. Cellule in coltura	A,20°C: 1416,95 cell/ml B20°C: 741,9 cell/ml C20°C: >4000 cell/ml D20°C:1264,91 cell/ml A,25°C:192,26 cell/ml B25°C:133,37 cell/ml C25°C: >4000 cell/ml D25°C:1132,8 cell/ml	M. Faimali <i>et al.</i> (2011)
<i>Dicentrarchus labrax (juveniles)</i>	% di mortalità (50h-48h) a 20°C e 25°C	LC50 <sub>96h</sub> 540,71 cell/ml	M. Faimali <i>et al.</i> (2011)

	trattamento A;B;C;D. Cellule in coltura		
<i>Tigriopus fulvus</i>	% di mortalità (50h-48h) a 20°C e 25°C trattamento A;B;C;D. Cellule in coltura	A,20°C: 1486,74 cell/ml B20°C: >4000 cell/ml C20°C: >4000 cell/ml. D20°C:967,70 cell/ml A,25°C: 250,12 cell/ml B25°C: 384,78 cell/ml C25°C: >4000 cell/ml D25°C:1264,91 cell/ml	M. Faimali <i>et al.</i> (2011)
<i>Dinophilus gyrociliatus</i> (polichete)	% di mortalità(da 2 a 96 h). Campioni ambientali.	La % aumenta nel tempo nei campioni contenenti circa 3500 cell/ml e 1500 cell/ml	R.Simonini <i>et al.</i> (2011)
<i>Paracentrotus lividus</i>	Inibizione della fertilità	Ridotta al 20% circa nei gameti maschili a una concentrazione algale di 1350 cell/ml. Incapacità di iniziare la segmentazione nello zigote se aggiunti ad una sospensione di cellule algali pari a 675cell/ml.	C.Caroppo e P. Pagliara (2011)

Il dato sui crostacei evidenzia una maggiore sensibilità di *Artemia franciscana* rispetto a *Tigropus fulvus* [C. Caroppo *et al.*, 2009].

Nei saggi riportati in Faimali *et al.* (2011), indipendentemente dal tipo di organismo test, ad eccezione di *Artemia salina*, l'effetto osservato con il solo mezzo di coltura (trattamento C) non è stato significativo. Tutto ciò suggerisce che, almeno per le cellule in coltura, la tossicità di *Ostreopsis cf. ovata* è legata all'alga stessa e non al rilascio della tossina nel mezzo di crescita. Inoltre, comunemente a tutte la specie e sempre in presenza dell'alga i maggiori effetti tossici si sono avuti con l'aumentare della temperatura. *A. salina*, rispetto a tutte le specie test utilizzate, si è dimostrata quella più sensibile [LC50 4 cell/ml] . Inoltre, le analisi istologiche hanno indicato che le cellule di *Ostreopsis* vengono ingerite dal crostaceo, contrariamente alle altre due specie testate.

Anche il polichete *Dinophilus gyrociliatus* [R. Simonini *et al.*, 2011] ha dimostrato una maggiore mortalità per ingestione e/o stretto contatto in presenza di elevata densità di *Ostreopsis cf. ovata*, facendo pensare ad una risposta di tipo allelopatico.

Ulteriori test sono stati eseguiti su *Mytilus galloprovincialis* raccolti in siti impattati dalle fioriture per valutare la presenza delle tossine direttamente nei tessuti [vedi

tabella), mentre gli effetti avversi biologici e tossicologici sono stati valutati attraverso alterazione della risposta immunologica, lisosomiale e neurotossica. Questi ultimi, hanno dimostrato una significativa inibizione dell'attività della pompa sodio/potassio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ ), riduzione dei granulociti, riduzione dell'attività fagocitaria e ridotta stabilità della membrana lisosomiale.

## **Conclusioni**

In considerazione delle scarse informazioni disponibili risulta molto importante sviluppare studi sulla tossicologia, al fine di mettere a punto procedure di facile applicazione e che diano risultati attendibili in tempi rapidi.

Dato il numero limitato di studi specifici non è ancora possibile stabilire con certezza la specie chiave più idonea per valutare gli effetti ecologici delle fioriture di *O. cf. ovata*. Tuttavia, il crostaceo *Artemia salina* è risultato l'organismo modello più sensibile alla presenza di cellule vive di *Ostreopsis cf. ovata* con valori di LC50 e inferiori a 4 cell/ml dopo 48h (Faimali et. al 2011). In particolare, i risultati con esposizione a campioni algali ambientali che mostrano il 100% di mortalità a concentrazioni < 10 cell/ml, rafforzano la necessità di un valore soglia ambientale e suggeriscono una revisione della soglia sanitaria adottata dal Ministero della Salute.

L'utilizzo del polichete *Dinophilus gyrociliatus* potrebbe avere il vantaggio di essere una specie sensibile anche ad altri contaminanti, di facile mantenimento in coltura e con un ciclo vitale breve. Inoltre i test richiedono piccoli campioni d'acqua, sono facili economici e rapidi.

Infine, gli studi delle alterazioni biologiche indotte nei mitili, mediante biomarker, costituiscono un primo tentativo di indagine sul meccanismo della tossicità a livello biochimico e cellulare e, considerati i risultati finora ottenuti, costituiscono buona base per approfondire le conoscenze sui meccanismi d'azione di queste biotossine algali.

In conclusione, gli studi disponibili fino ad oggi, non consentono di identificare le specie chiave più idonee per valutare gli effetti ecologici delle fioriture di *O. cf. ovata*, tuttavia emerge che i test di tossicità possono essere uno strumento utile a definire un valore soglia ambientale per determinare il rischio ecologico dei blooms.

## **Bibliografia**

- Caroppo C., Pagliara P., 2011. Effects of *Ostreopsis cfr ovata* (dinophyceae) toxicity on *Paracentrotus lividus* development. Biol. Mar. Mediterr., 18(1): 74-76.
- Caroppo C., Uva J., Prato E., Biandolino F. messa a punto di test biologici con crostacei per la valutazione della tossicità di *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae). Biol. Mar. Mediterr. (2009), 16(1):380-381.
- Caroppo C., Pagliara 2012. Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia cfr. monotis* and *Ostreopsis cfr. ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). Toxicon 60:1203-1214.
- Faimali M. Giussani V., Piazza V., Garaventa F., Corrà C., Asnaghi V., Privitera D., Gallus L., Cattaneo-Vietti R., Gorbi S., Bocchetti R., Binelli A., Bacchiocchi S., Orletti R., Nanetti

- L., Rafaelli F., Vignini A., Accorono S., Totti C., Regoli F., 2012. Biological effects of palytoxin-like compound from *Ostreopsis* cf. *ovata*. A multibiomarkers approach with mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 89:623-632.
- Gorbi S., Avio G.C., Benedetti M., Totti C., Accoroni S., Picchierri S., Bacchiocchi S., Orletti R., Graziosi T., Regoli F., 2013. Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology* 35:941-950.
- Mangialajo L., Chiantore M., 2011. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Marine Environmental Research*:1-11.
- Simonini R., Orlandi M., Abbate M., 2011. Is the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* harmful to Mediterranean benthic invertebrates? Evidences from ecotoxicological tests with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Marine Environmental Research*, 72:230-233.
- Paredes I., Rietjens I.M.C.M., Vieites J.M., Cabado A.G., 2011. Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union. *Toxicon* 58:336-354.
- Rossini G. P., Bigiani A., 2011. Palytoxin action on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological system. *Toxicon*, 57(3):429-439.

# CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ECOTOXICITY OF THREE SOIL FOAMING AGENTS USED IN MECHANIZED TUNNELING.

by D. Baderna<sup>a</sup>, E. Lomazzi<sup>b</sup>, A. Pogliaghi<sup>b</sup>, A. Passoni<sup>b</sup>, M.I. Petoumenou<sup>c</sup>, R. Bagnati<sup>b</sup>, S. Sforzini<sup>b</sup>, M. Lodi<sup>b</sup>, A. Viarengo<sup>c</sup>, E. Benfenati<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Environmental Chemistry and Toxicology, IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Via Giuseppe La Masa 19, 20156 Milan - Italy. - diego.baderna@marionegri.it/emilio.benfenati@marionegri.it

<sup>b</sup> Unit of Analytical Instrumentation, IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Via Giuseppe La Masa 19, 20156 Milan - Italy - renzo.bagnati@marionegri.it

<sup>c</sup> Department of Sciences and Technological Innovation (DiSIT), University of Piemonte Orientale "A. Avogadro", 15121 Alessandria, Italy - aldo\_giuseppe.viarengo@mfn.unipmn.it / susanna.sforzini@mfn.unipmn.it

---

**Abstract** - The construction of tunnels and rocks with mechanized drills produces several tons of rocky debris that are today recycled as construction material or as soil replacement for covering rocky areas. The lack of accurate information about the environmental impact of these excavated rocks and foaming agents added during the excavation process has aroused increasing concern for ecosystems and human health. The present study proposes an integrated approach for the assessment of the potential environmental impact of three foaming agents currently on the market and used in tunnel boring machines. The strategy includes chemical characterization with high resolution mass spectrometry techniques to identify the components of each product, the use of *in silico* tools to perform a similarity comparison among these compounds and some pollutants already listed in regulatory frameworks to identify possible threshold concentrations of contamination, and the application of a battery of ecotoxicological assays to investigate the impact of each foaming mixture on model organisms of soil and water communities. The study identified eleven compounds not specified on the material safety data sheets for which we have identified possible concentrations of contamination based on existing regulatory references. The bioassays allowed us to determine the no effect concentrations (NOAECs) of the three mixtures, which were subsequently used as threshold concentration for the product in its entirety. The technical mixtures used in this study have a different degree of toxicity and the predicted environmental concentrations based on the conditions of use are lower than the NOAEC for soils but higher than the NOAEC for water, posing a potential risk to the water communities due to the levels of foaming agents in the muck.

Keywords: Soil conditioning agents, *Pseudokirchneriella subcapitata*, Phytotest, *Daphnia magna*, *Eisenia andrei*

## Introduction

The most important change in the excavation industry is the switchover from "drilling and blasting" to the mechanized tunneling with tunnel boring machines (TBMs). Several tons of muck are produced by TBMs as a result of the excavation process. This byproduct is generally made of rock crushed into pieces of various size mixed

with foam generated by conditioning agents used to improve different parts of the excavation process. The most used conditioning agents are water, foams (glycol/glycol ether-based synthetic detergents or protein-based foaming agents), polymers (polyacrylamides, polyacrylates) and bentonite slurries, each with a different effect on the excavated soil and on the performance of the excavation. Most of these byproduct materials were classified as waste determining an huge economical impact on the overall cost of each tunneling project due to the disposal of the muck. Recently, several studies have been set up to promote excavation rocks from waste to resource by recycling in construction as aggregate in concrete or filling and paving material for roads and embankments and as a soil replacement for covering rocky areas. With the introduction of these new reuse mode, the concern about the potential adverse effects on the ecosystem and human health caused by these by-products has increased, particularly on the environmental fate and toxicity of the additives used as conditioners. Only limited information are available on the toxicity of conditioning agents and their interactions with other pollutants already existing in soils and waters.

In the present study we analyzed the chemical composition of three different commercial conditioning agents used in TBM tunneling and we applied an integrated strategy which includes *in silico* approach and ecotoxicological assays to evaluate the potential impact of these products. The chemical characterization was used to identify the composition of the technical mixtures, *in silico* analysis was applied to perform a similarity comparison among the identified compounds and some pollutants already listed in international regulatory frameworks and, finally, the ecotoxicological assays were employed to investigate the impact of each whole product focusing on effects on soil and aquatic organisms using respectively seeds of higher plants, the earthworm *Eisenia Andrei*, the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* as model organisms.

### **Materials and methods**

The conditioning agents were analyzed by high performance liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS) by using an LTQ-Orbitrap instrument with electrospray ionization (ESI). For the *in silico* similarity search, the identified compounds were used as test set while the list of regulatory compounds was used as training set. Toxmatch was used firstly to calculate the relevant descriptors (physicochemical, topological, geometrical and surface properties) of each molecule and then to compare those descriptors using similarity indices. Tanimoto nearest-neighbor was used to calculate similarity indices, ranging from 0 (no similarity) to 1 (total similarity). The 48h immobilization bioassays with crustaceans *D. magna* and the microplate-based algal growth inhibition assay with *P. subcapitata* were performed with deionized water containing different concentration of soil conditioning agents. The acute phytotoxicity test was done with seeds of cucumber (*Cucumis sativus*), sorghum (*Sorghum saccharatum*) and cress (*Lepidium sativum*) using OECD standard soils contaminated with different concentration of conditioning agents while toxicity studies with *Eisenia andrei* were done according to the OECD guideline 222 (OECD, 2004b) testing soil contaminated with 300 mg/kg of agents 1 and 2 or with 500 mg/kg for agent 3, according to typical operative concentrations used in TBM drilling based on mixture features.

## Results

Eleven compounds were identified as the most abundant in each product mixtures by HPLC-HRMS characterization (Table 1), showing the presence of the same principal compounds in the three conditioning agents: dodecyl hydrogen sulfate, tetradecyl hydrogen sulfate and other six (poly)ethoxylated derivatives and, only in C.A. 2, triethylene glycol monobutyl ether and two (poly)ethoxylated derivatives.

Table 1: Identified compounds in the investigated conditioning agents.

ID	NAME	Molecular Formula
1	Dodecyl hydrogen sulfate	C12H26O4S
2	2-(Dodecyloxy)ethyl hydrogen sulfate	C14H30O5S
3	2-[2-(Dodecyloxy)ethoxy]ethyl hydrogen sulfate	C16H34O6S
4	2-{2-[2-(Dodecyloxy)ethoxy]ethoxy}ethyl hydrogen	C18H38O7S
5	3,6,9,12-Tetraoxatetracos-1-yl hydrogen sulfate	C20H42O8S
6	Tetradecyl hydrogen sulfate	C14H30O4S
7	2-(Tetradecyloxy)ethyl hydrogen sulfate	C16H34O5S
8	2-[2-(Tridecyloxy)ethoxy]ethyl hydrogen sulfate	C17H36O6S
9	Triethylene glycol monobutyl ether	C10H22O4
10	Tetraethylene glycol, monobutyl ether	C12H26O5
11	Pentaethylene glycol, monobutyl ether	C14H30O6

Results of the similarity search are shown in figure 1. A similarity index of 0.8 was selected as exclusion criteria for similarity. Most of the identified compounds show a high similarity with anionic surfactants belonging to the families of "sodium laureth sulfate" (SLES) or "linear alkylbenzene sulfonate" (LAS) while only the Triethylene glycol monobutyl ether (ID9) shows the highest correlations with two glycol compounds.

Results of the ecotoxicological assays are shown in table 2 and 3, respectively for terrestrial and aquatic toxicity.

Table 2: Results of the terrestrial toxicity assays (expressed as mg/kg).

Agents	Possible soil concentration	Phytotest		<i>Eisenia andrei</i>
		LC50	NOAEC 72h	
1	313	4214	1545	> 313
2	312	6168	3801	> 312
3	500	6295	2948	> 500

Table 3: Results of the aquatic toxicity assays (expressed as mg/L).

Agents	Possible water concentration	<i>D. magna</i>		<i>P. subcapitata</i>	
		LC50	NOAEC 48h	LC50	NOAEC 72h
1	78	30.262	27.671	6.05	0.59
2	78	59.733	47.855	36.26	10.09
3	125	45.889	40.272	9.92	2.37

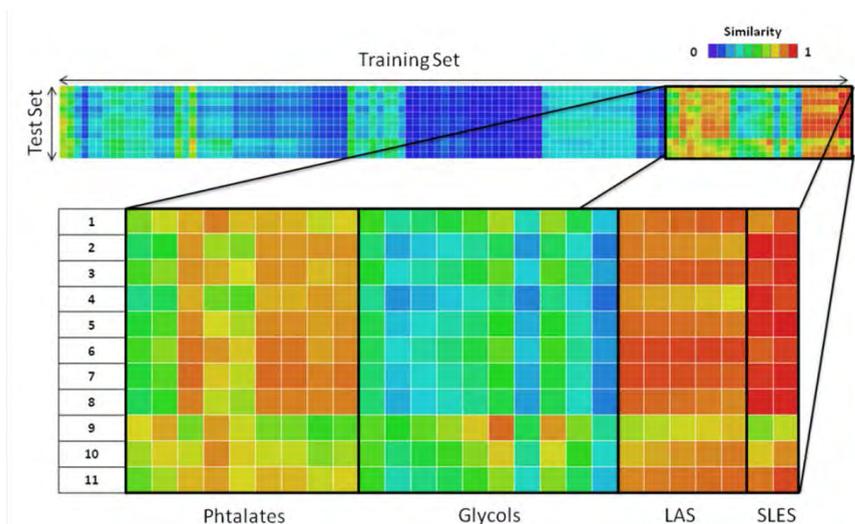


Fig. 1 : Similarity matrix of the identified compound with other known pollutants.

### Discussion

Eleven different compounds related to dodecyl and tetradecyl hydrogen sulfate and to triethylene glycol monobutyl ether were identified by chemical characterization. Regarding degradation processes, our results showed that products achieve complete degradation in 4-6 days in agreement with previous results supporting the hypothesis that the rapid biodegradation of these surfactants could in most cases prevent any significant leaching from soil to groundwater. We performed an *in silico* structure similarity analysis to find compounds most similar to the identified ones selecting for comparison several pollutants with known environmental profile. Most of the components of the 3 technical mixtures showed high similarity with anionic surfactants included in the families of sodium laureth sulfate or linear alkylbenzene sulfonate and only the triethylene glycol monobutyl ether had the highest correlations with two glycol compounds in the training set. Possible threshold concentrations of contamination for water and soils were found in The Italian Consolidated Environment Act, in the US EPA Regional Screening Levels and in the Danish soil quality criteria. The effects on aquatic and terrestrial communities were investigated by a battery of acute and chronic assays. To our knowledge, only limited data on the ecotoxicity of foaming agent are reported in literature. To compare our results with an hypothetical environmental exposure scenario we hypothesized a possible operative concentrations of 300-500 mg of foaming agent per kg of muck which can be easily achieved in real case of excavated debris. An aqueous eluate obtained mixing this muck with water in a 1:4 ratio, according to the APAT guidelines for soil investigation, should have a final concentration of about 75 - 125 mg of surfactants per liter of leachate. Integrating our results from aquatic and terrestrial assays, we can assume that the most toxic conditioning agent is the C.A. 1 while agents 2 and 3 have comparable toxicity, in particular for terrestrial organisms. It is important to empathize that these concentrations are considerably lower than those detectable in the eluate according to our exposure scenario, determining a serious hazard for the aquatic community.

## *Conclusions*

No strategies have been defined to investigate the environmental toxicology of mucks derived from TBM excavation. A multidisciplinary approach has thus been proposed to determine the potential environmental impact of 3 conditioning agents. Chemical characterization provided additional information on the chemical identity of the technical mixtures. Chemical structures were analyzed *in silico* to identify the similarity of the analyzed ingredients with other pollutants already listed in several regulatory framework. This information was finally combined with the results of direct testing of the conditioning agents with a battery of ecotoxicological assays in order to define possible soil and water threshold concentration. Our results show no significant risk for soil plants and invertebrates exposed to the analyzed products if used in typical operative concentrations while possible hazards may occur for aquatic organisms exposed to the aqueous leachate from the muck that may contain concentrations of foaming agents higher than those tolerated by the organisms. According to the obtained degradation pathways, it would be recommended to store the muck sheltered from rain for at least 4-6 days in order to avoid the production of aqueous eluate and to allow the degradation of the products.

## *References*

- Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (APAT), 2004. Proposta di guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori ecotossicologici e biologici. RTI CTN\_TES 1/2004.
- Baderna et al. Chemical characterization and ecotoxicity of three foaming agents used in mechanized tunneling [submitted].
- Bellopede, R., F. Brusco, P. Oreste and M. Pepino, 2011. Main aspects of tunnel muck recycling. *Am. J. Environ. Sci.*
- Gertsch L., Fjeld A., Nilsen B., Gertsch R., 2000. Use of TBM muck as construction material. *Tunnelling and Underground Space Technology*, 15 (4): 379-402.
- ISO 6341:2012. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus [Cladocera, Crustacea] - Acute toxicity test.
- Martignon G, 2009. Linee guida per la misura della tossicità dei suoli. Test di fitotossicità per il suolo. CESI RICERCA - ASV Ambiente e Sviluppo Sostenibile. Available at: <http://doc.rse-web.it/doc/doc-sfogliata/09000808-1996/09000808-1996.html>. [last access 7/1/2014]
- OECD, 2004. Guideline for testing of chemicals. No 222. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/andrei*).
- Tokgoz, 2013. Use of TBM excavated materials as rock filling material in an abandoned quarry pit designed for water storage. *Eng. geology*.

# EFFECT OF KETOPROFEN ON FRESHWATER MODEL ORGANISMS BIOASSAYS AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS.

by E. Mennillo<sup>a\*</sup>, M. Oliva<sup>a</sup>, G. Monni<sup>a</sup>, C. Pretti<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, S. Piero a Grado (PI), Italy –  
elvira.mennillo@gmail.com

\*Corresponding author: Elvira Mennillo - Dipartimento di Scienze Veterinarie, Via Livornese (Lato monte) - 56122 - S. Piero a Grado, PISA (Italy). Tel. +39 0502210147 - FAX + 39 0502210182 email: elvira.mennillo@gmail.com

---

**Abstract** - Pharmaceutical products and active metabolites can be considered as priority pollutants among the chemicals of emerging concern in surface waters. The use of pharmaceuticals for veterinary practice often results in their frequent presence in the waste water and environment. The aim of this study was to investigate the ecotoxicity of ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), in the environmental concentration range reported in literature for surface waters. The study was performed both through a bioassay and a biomarker approach. *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus* were used as model organisms in acute and chronic bioassays. Enzymatic oxidative stress cellular defences (biomarkers) were evaluated in *L. variegatus*. *V. fischeri* assay revealed absence of acute toxicity even if a biostimulation effect at highest concentrations (1000-2000 µg/L) was observed. The unicellular alga *P. subcapitata*, in a 72 h exposure assay, showed an EC<sub>50</sub> value of 247 µg/L, LOEC of 10 µg/L and NOEC 5 µg/L. Absence of mortality (EC<sub>50</sub>>2000 µg/L) were observed in acute toxicity assays with *D. magna* (24 h exposure) and *L. variegatus* (96 h). The oxidative stress biomarkers analysis, performed on *L. variegatus* exposed to ketoprofen in a 96 h daily-renewal experiment, showed an increased enzymatic turn-over activity for glutathione S-transferase and glutathione reductase only at highest concentration (1000 µg/L).

Keywords: NSAIDs, ketoprofen, bioassays, biomarker, ecotoxicity.

## Introduction

Veterinary medicines are used worldwide to protect animal health, prevent economic loss, and help ensure a safe food supply (Boxall et al., 2002; Halling-Sørensen et al., 2002). After use, the pharmaceuticals may reach waterways and possibly pose environmental challenges. Several studies have reported the occurrence of various veterinary pharmaceuticals in surface water, groundwater, and wastewater treatment plant effluents (Hirsch et al., 1999; Kolpin et al., 2002; Yang and Carlson, 2003). Many of these compounds could be degraded in the environment by biotic or abiotic process and could act as persistent compounds causing an effect on non-target species. Therefore, the risk of veterinary pharmaceuticals have become an emerging issue in environmental toxicity. The runoff from manure-treated farmlands is also one of the major sources of veterinary pharmaceuticals to the environment. Once released into the environment, pharmaceuticals and their metabolites may run

into surface waters or leach to groundwater where they may affect the ecosystem as well as human health [Koschorreck et al., 2002]. Globally, concentrations measured in STP effluents and in aquatic environment were in the nanograms-per-liter to micrograms-per-liter range [Halling-Sorensen et al., 1998]. Due to the lack of information about drugs ecotoxicity data, there is a real difficulty to perform an environmental risk characterization, even if few information are available for selected human pharmaceuticals about their persistence in the environment, removal mechanisms or ecotoxicity [Ayscough et al., 2000; Webb, 2001]. In UE, the regulatory issues for NSAIDs risk assessment were described in a discussion paper (EMA, 2001); the procedure follows the general principle of the environmental risk procedure as applied to conventional chemicals in Europe [TGD, 1996]. Ketoprofen is one of the most popular non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID<sub>s</sub>) widely used in veterinary practice to relieve acute pain, frequently administered in association regimen with other drugs. Studies reported detected concentrations in surface water ranging from 0,41 to 5,7 µg/L [Fent et al., 2006]. The aim of this study was to investigate the ecotoxicity of ketoprofen in an environmental concentration range using a bioassay- and a biomarker- approach. Freshwater organisms (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*) were used in acute and chronic bioassays. The oxidative stress (biomarker approach) was evaluated by measuring catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) activities in *Lumbriculus variegatus* after a 96h-exposure to different concentrations of ketoprofen (50, 250 and 1000 µg/L).

### **Material and methods**

Ketoprofen 2-(3-Benzoylphenyl) propionic acid was purchased from Sigma-Aldrich. Dilutions were prepared directly with the different culture media. An ecotoxicological test battery was adopted for toxicity evaluation, as following:

- *Vibrio fischeri*: the inhibition of bioluminescence test was performed according to standard operating procedure using the Basic protocol (Azur Environmental, 1995) based on the ISO procedures (ISO 11348-3: 2007). Bacteria were obtained from Ecotox LSD (Pregnana Milanese, Italy) as freeze-lyophilized cells. For identification of ecotoxicological parameters such as EC<sub>20/50</sub> a full test was performed with dilution series (from 2000 µg/L to 4,062 µg/L, 10 dilutions 1:1 v:v). Bacteria were exposed to a dilution and their light emission was determined after incubation (5, 15 and 30 minutes) and compared to an aqueous control.

- *Pseudokirchneriella subcapitata*: the inhibition of growth was evaluated according to the protocol described in ISO procedures (ISO 8692: 2012) with slight modifications. *P. subcapitata* strain CCAP 278/4 was purchased from the reference centre CCAP. For the determination of EC<sub>50</sub>, LOEC and NOEC a full test was performed by different dilutions. Experiments were performed in triplicate.

- *Daphnia magna*: the immobilization/mortality was evaluated after 24 hours. A full test was performed in according to the OECD procedure (OECD 202: 2004).

- *Lumbriculus variegatus*: the mortality was assessed after 96 hours. Different dilutions were tested following the procedure described in the procedure OECD 225 (OECD 225: 2007).

- *Lumbriculus variegatus* 96 hours exposure: oxidative stress

Pools of fifty worms were exposed to three different dilutions daily-renewed (50, 250 and 1000 µg/L) in 200 mL volume. Test was performed at 25±1 °C (16h light/8 h darkness photoperiod). After the exposure, worms were collected and homogenized in ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 8). Crude homogenates were centrifuged

at 10000 rpm for 30 minutes and supernatants were collected into aliquots and stored at -80 °C until used for the enzymatic determinations (CAT, GR and GST). On supernatants the protein content was measured by the method of Lowry et al., (1951).

CAT activity was determined by measuring the decrease in absorbance at 240 nm due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption (Aebi, 1984) and the activities were expressed as µmoles/min/mg of protein.

GR activity was measured by following the decrease in absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH (Wheeler et al., 1990) and the activities were expressed as nmoles/min/ mg of protein. GST was determined according to Habig and Jacoby (1981) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate at 340 nm. Enzymatic activities were expressed as nmoles/min/mg of protein. All determinations runned in triplicate.

#### Statistical analysis

All data were represented as mean ± standard deviation (or confidence limits). One-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparisons against control were conducted for data analyses (PRISM software, Graphpad Software). Magnitude values with p≤0,05 were considered statistically significant.

### Results

*Vibrio fischeri* bacteria showed absence of inhibition of bioluminescence in the concentration range 4-500 µg/L. The concentration of 2000 µg/L showed high levels of biostimulation at 15 min incubation [I% value: -17,90, data not shown].

*Pseudokirchneriella subcapitata* the growth of *P. subcapitata* in a 72 h test was significantly inhibited respect to control (figure 1). Ketoprofen showed a LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) of 10 µg/L, NOEC (No Observed Effect Concentration) of 5 µg/L and an EC<sub>50</sub> (effect concentration) value of 247 µg/L [95% CL 0,21-0,28].

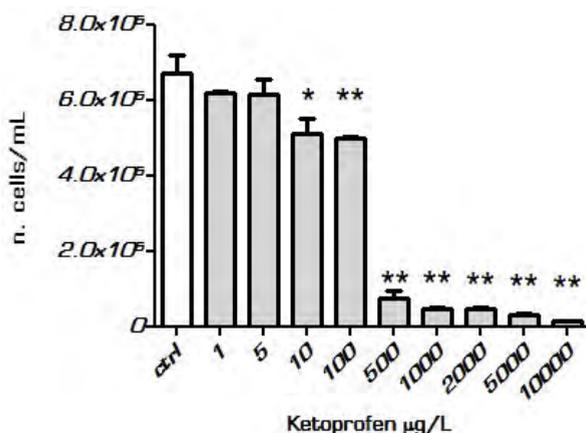


Figure1. Growth inhibition of *P. subcapitata* cells exposed to different dilutions of Ketoprofen (72 h incubation). Results are expressed as mean of 3 independent experiments (n=3 for each exposure) ± SD of number of cells/mL. Data were compared by one-way ANOVA (Dunnett's Test). Significantly different from control \* P<0,01, \*\* P<0,001.

*Daphnia magna*: in the acute toxicity test (24 h) no immobilization/mortality was recorded in control and treated indicating absence of acute toxicity.

*Lumbriculus variegatus*: mortality/immobilization test (96 h) showed absence of toxicity, even at highest concentrations.

*Lumbriculus variegatus* 96 h exposure - oxidative stress biomarkers: in figure 2 CAT activity in control group showed an activity of  $1,48 \pm 0,04$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein. No statistically differences from control group and treated groups were observed.

GR and GST showed a control activity of  $2,57 \pm 0,08$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  prot and  $38,91 \pm 3,02$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  prot, respectively. In both cases, no significant differences were observed in all treated groups, except for 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$ -treatment that significantly differs ( $p < 0,0001$ ) from control group.

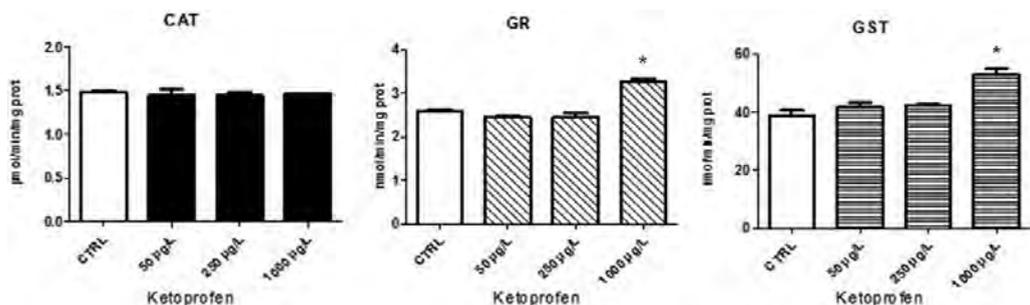


Figure 2. CAT activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein), GR and GST activity ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein) in 10000xg supernatants of *L. variegatus* 96 h-exposed to 50- 250- 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$  Ketoprofen. Significantly different from control \*  $p < 0,0001$ ; Dunnett's Multiple Comparison Test.

## Discussion

Few ecotoxicological data are available for ketoprofen. As example, in Veterinary Substances DataBase (VSDb, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>) ecotoxicological data for ketoprofen are totally absent. Other information can be obtained from scientific literature. Minguez et al. (2014) observed an  $\text{EC}_{50}$  value for *P. subcapitata* about 200-fold higher than observed in our study. However, the obtained value (Minguez et al., 2014) probably was overestimated since authors performed the assay with a microplate method instead of larger volumes. In *D. magna* acute toxicity test an  $\text{EC}_{50}$  value very far from environmental concentration ( $>2000$   $\mu\text{g}/\text{L}$ ) was observed accordingly with Minguez et al. (2014). In our study absence of toxicity was observed also in *L. variegatus* acute toxicity test. For *V. fischeri* assay the higher concentration did not exhibit a bioluminescence inhibition effect demonstrating that  $\text{EC}_{50}$  value was over 2000  $\mu\text{g}/\text{L}$ ; other authors (Farrè et al., 2001) reported, for *V. fischeri* assay,  $\text{EC}_{50}$  values in the  $\text{mg}/\text{L}$  range, far from the environmental concentration. Biomarkers data in organism of ecological relevance are available for several NSAIDs such as ibuprofen and diclofenac (Parolini et al., 2009; Aguirre-Martinez et al., 2013) in bivalves but for ketoprofen there is a lack of information for any organism of ecological relevance. Our biomarkers-related data obtained in the freshwater oligochaete *L. variegatus* indicated that in a 96h-exposure experiment only 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$  concentration exhibited a significant increase of GR and GST enzymatic activities.

## Conclusion

Results showed the absence of ecotoxicity at environmental concentrations for the tested organisms. More investigations especially with chronic bioassays may contribute to better understand the impact of ketoprofen on non-target species. Moreover, another important aspect to consider is the effect of pharmaceuticals residues in marine environments, because this aspect is poorly documented. In this study, we evaluated the environmental impact of racemic mixture of ketoprofen. It could be interesting to assess also the toxicity of right-handed enantiomer of ketoprofen (dexketoprofen) and of its different biotransformation products.

## References

- Aebi H 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology. 105, 121-126.
- Aguirre Martinez G V, Buratti S, Fabbri E, Del Valls A T, Martín-Díaz M L. 2013. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. Journal of Environmental Sciences. 25 (7), 1408-1418.
- Ayscough N J, Fawell J, Franklin G, Young W. 2000. Review of human pharmaceuticals in the environment. Technical Report P390, Environment Agency, Bristol.
- Azur Environmental (1995). Microtox Acute Toxicity Basic Test procedures. Azur Environmental, Carlsbad, California [USA].
- Boxall A B A, Fogg L A, Blackwell P A, Kay P, Pemberton E J. 2002. Review of veterinary medicines in the environment. R&D Technical Report P6-012/8TR. UK Environment Agency, Bristol.
- EMEA, 2001. Draft CPMP Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Nongenetically Modified Organism (non-GMO) Containing Medicinal Products for Human Use. Report CPMP/SWP/4447/00, 25 January 2001. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London.
- Fent k, Weston A A, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology. 76:122- 159.
- Ferrè M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L, Tirapu L, Vilanova M, Barcelò I. 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry : methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. Journal of Chromatography A. 938, 187-197.
- Habig W H and Jacoby W B. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). Methods Enzymology. 77, 218-231.
- Halling-Sørensen B, Nielsen S N, Jensen J. 2002. Environmental assessment of veterinary medicinal products in Denmark. Environmental Project No. 659. Danish Environmental Protection Agency.
- Halling-Sorensen B, Nielsen S N, Lanzky P F, Ingerslev F, Holten Lützhof H C, Jørgensen S E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. Chemosphere 36, 357–393.
- Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz K L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Sci. Total Environ. 225, 109–118.
- ISO (2007). ISO 11348-3: Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Part 3: method using freeze-dried bacteria.
- ISO (2012). ISO 8692: Water quality. Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.

Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, Thurman E M, Zaugg S D, Barber L B, Buxton H T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.

Koschorreck J, Koch C, Ronnefahrt I. 2002. Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU—a regulatory perspective. *Toxicol. Lett.* 131, 117–127.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr L, Randall R J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* 193, 265-275.

Minguez L, Pedelucq J, Farcy E, Ballandonne C, Budzinski H, Halm-Lemeille M P. 2014. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Pharmaceuticals in the aquatic environment Environ Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-014-3662-5.

OECD guideline for testing of chemicals, section 2: effect on biotic system. 2004. *Daphnia* sp. acute immobilisation test. OECD Test No. 202.

OECD guideline for testing of chemicals, section 2: effect on biotic system. 2007. Sediment-Water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. OECD Test No. 225.

Parolini M, Binelli A, Cogni D, Riva C, Provini A. 2009. An *in vitro* biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology in Vitro.* 23, 935-942.

TGD, 1996. Technical Guidance Document in support of Council Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Webb S F. 2001. A data-based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals I-collation of available ecotoxicity data. In: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment—Sources, Fate, Effects and Risks.* Springer, Berlin, pp. 175–201.

Wheeler C R, Salzman J A, Elsayed N M, Omaye S T, Korte Jr D V. 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry.* 184(2), 193-199.

Yang S, Carlson K. 2003. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Res.* 37, 4645–4656.

# BATTERIA DI TEST ECOTOSSICOLOGICI NEL MONITORAGGIO DELL'ACQUA DI RISAIA E DEI CANALI ADDUTTORI DELLE PROVINCIE DI VERCELLI E NOVARA NEL PERIODO DI UTILIZZAZIONE DEI FITOFARMACI

di S. Finotti<sup>a</sup>, A. Marola<sup>a</sup>, L. Ropolo<sup>a</sup>, L. Tartaglino<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Arpa Piemonte

---

**Abstract** -.La monocoltura risicola del vercellese, e conseguentemente la necessità di coltivare la pianta in immersione nei primi mesi dopo la semina, ha originato un reticolo idrografico unico in tutta Europa. Il Dipartimento ARPA di Vercelli ha eseguito nel 2013 uno studio teso a verificare lo stato di inquinamento e di ecotossicità delle acque presenti nei canali irrigui e nelle acque di risaia. I principi attivi dei fitosanitari ricercati sono stati 69, comprendendo sia prodotti utilizzati prevalentemente nella coltura risicola che fitosanitari utilizzati in altre colture o per usi industriali. Sono stati inoltre valutati i parametri ecotossicologici. I prelievi e le analisi conseguenti sono stati in totale 100; 72 analisi eseguite su acque di risaia e 28 su acqua di canali irrigui. Le analisi hanno riscontrato la presenza di principi attivi in 21 casi nelle acque di canale e in 153 casi nelle acque di risaia. Il principio attivo maggiormente riscontrato è l'Oxadiazone trovato 72 volte pari al 42% dei principi attivi riscontrati. Le analisi eco tossicologiche hanno evidenziato 32 superamenti del valore di I% = 20, valore questo che classifica statisticamente un valore di attenzione. Di questi 32 superamenti 7 rappresentavano un valore di I% maggiore di 50 e sono pertanto interpretabili come biotossici.

## **Introduzione**

La monocoltura risicola del vercellese, e conseguentemente la necessità di coltivare la pianta in immersione nei primi mesi dopo la semina, ha originato un reticolo idrografico unico in tutta Europa.

Il Dipartimento ARPA di Vercelli ha eseguito nel 2013 uno studio teso a verificare lo stato di inquinamento e di ecotossicità delle acque presenti nei canali irrigui e nelle acque di risaia (Figura 1). I principi attivi dei fitosanitari ricercati sono stati 69, comprendendo sia prodotti utilizzati prevalentemente nella coltura risicola che fitosanitari utilizzati in altre colture o per usi industriali.

Sono stati valutati i parametri ecotossicologici. I prelievi e le analisi conseguenti sono stati in totale 100: 72 analisi eseguite su acque di risaia e 28 su acqua di canali irrigui. Le analisi chimiche hanno riscontrato la presenza di principi attivi in 21 casi nelle acque di canale e in 153 casi nelle acque di risaia. Il principio attivo maggiormente rilevato è l'Oxadiazone trovato 72 volte pari al 42% delle positività (Figura 2).

Le analisi ecotossicologiche hanno evidenziato 32 superamenti del valore di I% = 20, valore questo che classifica statisticamente un valore di attenzione. Di questi 32 superamenti 7 rappresentavano un valore di I% maggiore di 50 e sono pertanto interpretabili come biotossici (Figura 3).

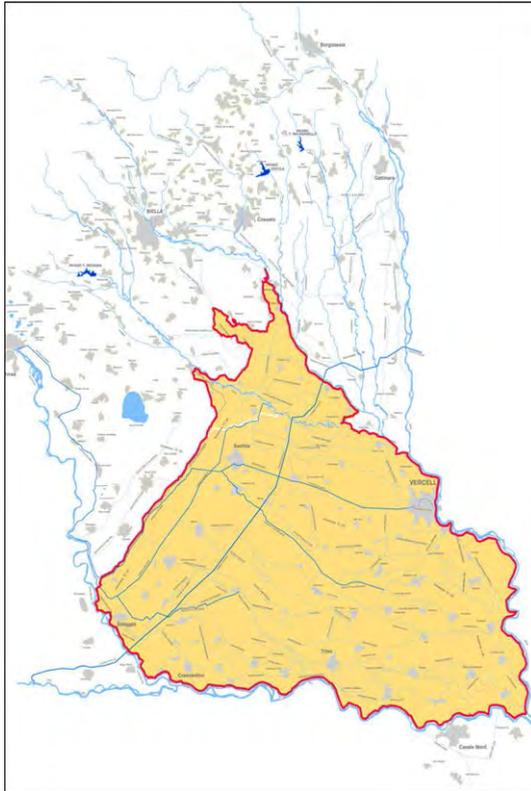


Figura 1 – Area di studio: localizzazione delle risaie e canali irrigui indagati.

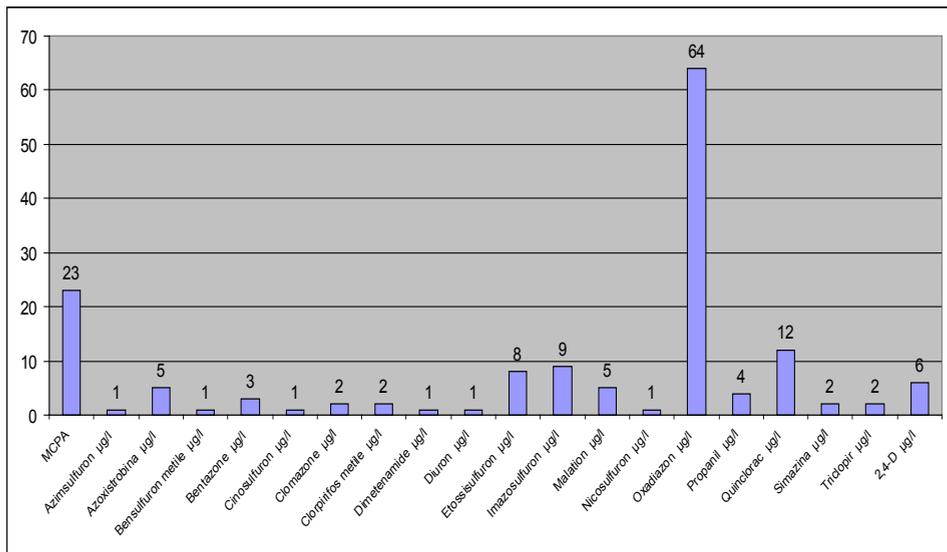


Figura 2 – Risultati delle analisi chimiche.

## Materiali e metodi

Le analisi ecotossicologiche sono state eseguite su campioni di acqua di risaia (Figura 1) prelevati in periodi colturali diversi. I test effettuati sono stati i seguenti: Inibizione della mobilità del crostaceo *Daphnia magna* utilizzando il metodo UNI EN ISO 6341:2013, inibizione della luminescenza del batterio *Vibrio fischeri* applicando il metodo APAT CNR-IRSA metodo 8030 Man 29/2003, inibizione della crescita algale utilizzando l'alga monocellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* con la metodica UNI EN ISO 8692:2012

## Risultati

Su 72 acque di risaia sottoposte ai tre test ecotossicologici nove campioni hanno presentato un'inibizione della crescita superiore al 50 % per il parametro algale relativo all'organismo *Pseudokirchneriella subcapitata*, tale valore è posto dalla vigente normativa ambientale relativa agli scarichi produttivi in acque superficiali, quale discriminare per la definizione di tossicità. Considerando inoltre il limite del 20% di inibizione sono risultati superiori a tale valore, e comunque inferiori al 50 %:

12 campioni del test con *Vibrio fischeri*

7 campioni del test con *Daphnia magna*

16 campioni del test con *Pseudokirchneriella subcapitata*

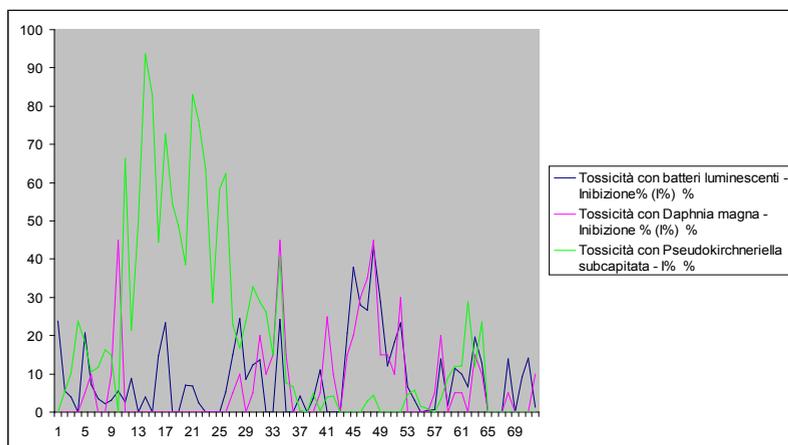


Figura 3.- Risultati dei test eco tossicologici.

## Conclusioni

Alla luce delle analisi effettuate si può affermare che il 67% dei campioni testati ha presentato un valore di attenzione o addirittura tossico dal punto di vista ecotossicologico.

Vale la pena ricordare che le acque di risaia vengono restituite al reticolo idrografico e attraverso i canali e i fiumi recettori raggiungono l'ambiente marino, e specificamente nel caso della zona risicola vercellese e novarese, attraverso il fiume Po giungono al mare Adriatico. Sono state eseguite anche le analisi chimiche su un

set analitico composto da 69 principi attivi. Nella tabella 2 sotto riportata si evidenzia il numero di volte in cui il lo stesso è stato riscontrato nelle analisi.

### *Bibliografia*

DECRETO LEGISLATIVO 3 aprile 2006, n. 152 – Norme in materia ambientale.  
APAT IRSA- CNR 8030 Man 29/2003 Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti.  
UNI EN ISO 6341:2013 “Qualità dell’acqua – Determinazione dell’inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Prova di tossicità acuta.  
UNI EN ISO 8692:2012 “Prova di inibizione della crescita di alghe d’acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari”.

# SAGGI BIOLOGICI PER IL CONTROLLO DELLA TOSSICITÀ IN ACQUE DA ITTIOCOLTURA CONTENENTI ANTIBIOTICI DOPO FOTOCATALISI CON LUCE UV-A E NANO-TiO<sub>2</sub> IMMOBILIZZATO.

di M. Francese<sup>a</sup>, P. Frisenda<sup>a</sup>, M. Pflieger<sup>b</sup>, Franko M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Shoreline Soc. coop., AREA Science Park - Trieste (IT) - shoreline@shoreline.it

<sup>b</sup> Laboratory for Environmental Research, University U.N.G. – Nova Gorica (SLO)

---

**Abstract** -. Nell'ambito del progetto INNOV-H2O (Programma Coop. Transfrontaliera Ita-Slo 2007-2013) rivolto alla creazione di un network per la ricerca innovativa in ittiocoltura, il gruppo di ricerca dell'Università di Nova Gorica ha sviluppato il prototipo di un sistema per il trattamento delle acque di processo da allevamenti di pesce. Il foto-reattore circolare, composto da barre di nano-TiO<sub>2</sub> immobilizzato e da lampade UV-A, ha la funzione di degradare contaminanti organici o microrganismi attraverso un processo foto-catalitico. L'utilizzo sperimentale dello strumento in questa prima fase è stato finalizzato alla rimozione di antibiotici e dei loro sottoprodotti di trasformazione. Il controllo sull'efficacia della tecnologia, oltre alle analisi chimiche sulle molecole specifiche, ha verificato l'assenza di tossicità residua nelle acque dopo il trattamento sotto luce UV-A, in presenza o assenza di TiO<sub>2</sub>. I campioni prelevati ad intervalli temporali crescenti sono stati testati mediante una batteria di saggi biologici (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lepidium sativum*). Batteri e microalghe si sono dimostrati efficaci, rilevando l'aumento di tossicità solo nelle prime fasi di trattamento, con una eliminazione completa della tossicità residua nell'arco di due ore e mezza. I saggi biologici si sono dimostrati dunque complementari al controllo analitico chimico e funzionali alla validazione del prototipo in ambiti simili di applicazione.

**Keywords:** fotocatalisi, TiO<sub>2</sub>, batteria saggi, antibiotici.

## **Introduzione**

I risultati riportati in questo articolo appartengono ad una delle sperimentazioni tenutasi nell'ambito del progetto INNOV-H2O (progetto del Programma di Cooperazione. Transfrontaliera Italia - Slovenia 2007-2013 finanziato dalla Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia) (<http://www.innov-h2o.eu/>), svoltasi tra i due partner di progetto PP4 (Shoreline soc. coop.) e PP5 (Università di Nova Gorica SLO). La finalità era quella di perseguire il miglioramento delle condizioni delle acque di allevamento delle due più comuni specie allevate, la spigola e la trota. La ricerca si è concentrata sulla rimozione di antibiotici mediante fotocatalisi con luce UV-A e tecnologia al TiO<sub>2</sub>. L'efficacia della rimozione di sostanze pericolose è stata valutata proprio applicando una batteria di saggi biologici a campioni di acque trattate a diversi intervalli temporali.

## **Materiali e metodi**

Il prototipo di foto-reattore utilizzato nelle sperimentazioni è stato progettato e messo a punto all'Università di Nova Gorica ed è costituito da un sistema circolare, composto da 11 barre con layer di nano-TiO<sub>2</sub> e da 6 lampade UV-A. La capacità dello strumento è quella di degradare contaminanti organici o microrganismi attraverso

un processo foto-catalitico forzato, più rapido dunque della normale fotodegradazione in condizioni naturali sotto la luce solare.

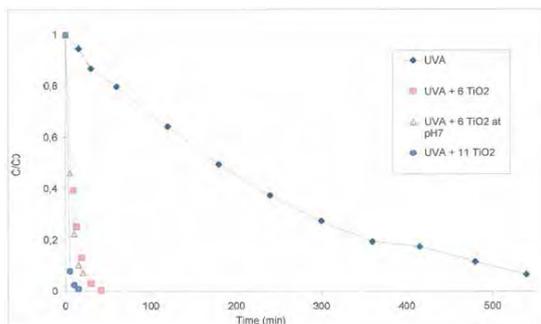
In questa prima fase sperimentale il sistema è stato applicato per valutare la sua efficienza nella rimozione di antibiotici (qui riportiamo il test con *spiking* di 25mg/L di ciprofloxacina in acqua dolce) e dei loro sottoprodotti di trasformazione.

Risultando questi ultimi più pericolosi, perché notoriamente più biodisponibili, si è proceduto a valutare l'effetto dei residui del trattamento applicando una batteria di saggi biologici: *Vibrio fischeri* (UNI EN ISO 11348-3:2007 modificato ad hoc con SOP di laboratorio), *Pseudokirchneriella subcapitata* (UNI EN ISO 8692:2012) e *Lepidium sativum* (UNICHIM 1651:2003).

Le analisi sono state condotte sul campione madre e sui campioni trattati, dopo fotocatalisi con luce UV-A, ad una temperatura di 30°C, con insufflazione di O<sub>2</sub>, sia in presenza che in assenza delle barre di TiO<sub>2</sub>. Per la valutazione della tossicità sono stati prelevati campioni ai seguenti intervalli temporali durante il processo di degradazione delle molecole di antibiotico: *initial solution*, 10', 20', 30', 40', 60', 2h30'A, 2h30'B.

### Risultati e Discussione

I risultati riportano i dati della degradazione della ciprofloxacina in soluzione e dei suoi sottoprodotti formati a seguito del processo foto-catalitico (dati simili sono stati ottenuti nella sperimentazione con ossitetraciclina).



Riportando i dati di concentrazione di antibiotico misurata nei campioni prelevati ad intervalli temporali e rapportati alla concentrazione iniziale (Figura 1), risulta evidente che l'efficacia del trattamento migliora all'aumentare del numero di barre di TiO<sub>2</sub> utilizzate.

Figura 1 – grafico della cinetica di degradazione a diverse condizioni

Il test acuto con *Vibrio fischeri* (30min), seguendo da vicino la cinetica della fotocatalisi (Figura 2), ha evidenziato un aumento notevole della tossicità nei campioni trattati da 0 a 30 minuti ed una successiva diminuzione dell'effetto (inferiore al 10%) già ai 60 minuti di trattamento, sino alla completa assenza di tossicità dopo i 100 minuti. Al contrario l'effetto dei sottoprodotti derivati dalla degradazione dell'antibiotico per sola fotocatalisi, in assenza di TiO<sub>2</sub>, è superiore al 30% anche dopo i 500 minuti.

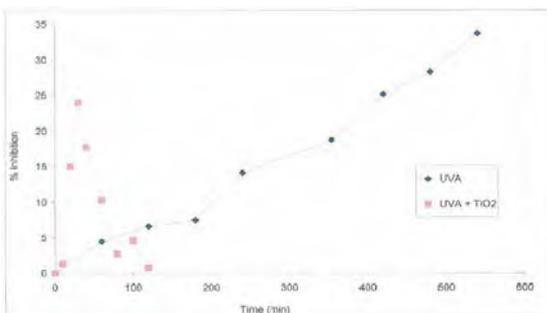


Figura 2 – grafico della percentuale di inibizione di *V. fischeri* a diverse condizioni di trattamento

Il test sub- cronico con *Lepidium sativum* (72h) ha evidenziato una leggera inibizione nel campione *Initial solution* e nel campione a 60 minuti di trattamento (Figura 03). Per tutti gli altri campioni non è stato rilevato alcun effetto, non riuscendo quindi a determinare una differenza tra soluzione iniziale e finale.

Infine, per quanto riguarda il saggio con l'alga unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata*, questo ha ben discriminato i campioni evidenziando prima di tutto una coerenza temporale delle risposte per ogni trattamento, indicando che già dopo 10' è presente un abbattimento del

INHIBITION ALGAE			
test	INHIBITION ALGAE		
SPECIE	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
durata	72h		
data test	03/04/2013		
IG per tempo di esposizione			
tempo trattamento	24h	48h	72h
Ctrl	0	0	0
initial sol.	-195,5015745	-151,7190693	-105,6215176
10	-73,67206674	-72,21559966	-32,47972081
20	-119,4494768	-74,59300536	-38,38222515
30	-93,53771297	-46,9333532	-25,12488973
40	-62,59712126	-57,37891827	-26,70124205
60	-12,79735775	-4,35116895	9,11541404
2h30'A	8,226708503	11,77831524	7,166000077
2h30'B	-23,62094325	7,742365501	0,214507513

Figura 4 – tabella valori indice di crescita (valore negativo è inibizione) dello sviluppo della popolazione algale.

0%) (Figure 4 e 5).

Confrontando i risultati del saggio algale alle 24 e 48 ore di esposizione con quelli alle 72 ore, si può osservare un andamento simile nei diversi campioni (tempi di trattamento crescenti), per quanto ancora non definito nelle letture intermedie del saggio (blu e rosso vs. verde in figura 5).

### Discussione e conclusioni

L'assenza di tossicità a fine trattamento è stata dunque provata mediante l'applicazione di saggi biologici, dimostrando così l'efficacia del foto-reattore con  $TiO_2$ , in grado di indurre un processo di fotocatalisi accelerato, utile per la rimozione degli antibiotici in acqua. Tra i saggi biologici, quelli con *V. fischeri* e *P. subcapitata* si sono dimostrati particolarmente efficienti, sottolineando ancora una volta l'importanza dell'uso di una batteria e non del singolo test per un giudizio corretto.

test	FITOTOX
SPECIE	<i>Lepidium sativum</i>
durata	72h
data test	05/04/2013

tempo trattamento	tempo esposizione	IG%
Iniz. Sol.	72h	71,7
10'	72h	90,1
20'	72h	102,3
30'	72h	85,5
40'	72h	96,4
60'	72h	76
2_30	72h	82,8
2_30'	72h	91,4

Figura 3 – tabella valori percentuale dello sviluppo dei semi di

70% circa della tossicità (si passa da 106% a 32% di inibizione del tasso di crescita) (Figura 4).

Nei prelievi eseguiti dopo, 20', 30' e 40' è presente una lieve tossicità (inibizione superiore al 20%) mentre dopo 60' non si rileva tossicità (lettura alle 72h inferiore al 10%) (Figure 4 e 5). Confermando quanto rilevato da *V. fischeri* (Figura 2), anche il test algale evidenzia la scomparsa di inibizione alle 2 ore e mezza (lettura alle 72h prossima allo

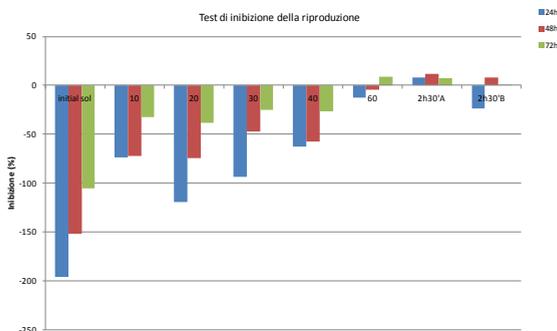


Figura 5 – grafico della percentuale di inibizione di *P. subcapitata* per ogni campione nei tre intervalli di lettura

Infine è stato dimostrato ancora una volta che la valutazione degli effetti e non solo delle concentrazioni, consente una comprensione migliore del fenomeno e che al contempo può validare il funzionamento di un prototipo.

### ***Ringraziamenti***

Gli autori desiderano ringraziare i partner del progetto INNOV-H2O ([www.innov-h2o.eu](http://www.innov-h2o.eu)) e gli allevatori di pesce che si sono prestati per questa sperimentazione.

### ***Bibliografia***

Pflieger M., Franko M. (2014) Fate and removal of pharmaceuticals in waters from aquaculture : the case of ciprofloxacin. V: 8th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment & 14th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Ioannina, Greece, September 2014. Abstract book. [S. l.: s. n.], 2014, str. 38-39.

Pflieger M., Francese M., Frisenda P., Franko M. (2013) Degradation and ecotoxicity of fluoroquinolones used in aquaculture : the case of ciprofloxacin. V: Slovenski kemijski dnevi 2013, Maribor, 10. in 12. september 2013. Kravanja, Zdravko (ur.), Brodnjak-Vončina, Darinka (ur.), Bogataj, Miloš (ur.). Zbornik povzetkov referatov s posvetovanja. Maribor: FKKT, 2013, str. 144. [COBISS.SI-ID 2874619]

Pflieger M., Francese M., Frisenda P., Franko M. (2013) Photocatalytic degradation of antibiotics used in aquaculture. V: 3rd European Symposium on Photocatalysis, September 25-27 2013, Portorož, Slovenia. FRESNO, Fernando (ur.). Book of abstracts. Nova Gorica: University, 2013, str. P2-32. [COBISS.SI-ID 2908155]

Pflieger M., Francese M., Frisenda P., Franko M. (2013) Photodegradation and toxicity of ciprofloxacin used in aquaculture. V: 14th European Meeting on Environmental Chemistry, December 4th to 7th 2013, Budva, Montenegro. JACIMOVIĆ, Željko (ur.). Book of abstract : 14th European Meeting on Environmental Chemistry, December 4th to 7th 2013, Budva, Montenegro. Podgorica: Chemical Society of Montenegro, 2013, str. 61-62. [COBISS.SI-ID 2977275]

ISO 8692:2012 (2012) Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae.

ISO 11348-3:2007 (2007) Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria.

UNICHIM N. 1651: 2003 (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).

# CONVALIDA DELLA PROCEDURA PER LA DETERMINAZIONE DI ECOTOSSICITÀ DEI RIFIUTI (H14): RISULTATI DELLO STUDIO COLLABORATIVO ISPRA SCO07

di E. Raso<sup>A</sup>, D. Conti<sup>A</sup>, S. Balzamo<sup>A</sup>, A. Paina<sup>A</sup>, P. De Zorzi<sup>A</sup>, S. Barbizzi<sup>A</sup>, S. Rosamilia<sup>A</sup>, T. Guagnini<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

elisa.raso@isprambiente.it

daniela.conti@isprambiente.it

stefania.balzamo@isprambiente.it

---

**Abstract** - In Italia, con la conversione in legge del DL 2/2012, la caratteristica di pericolo "ecotossico" (H14) ai rifiuti deve essere attribuita secondo le modalità dell'accordo ADR (Accordo internazionale per il trasporto di merci pericolose su strada) per la classe 9, categorie M6 ed M7.

In Europa la determinazione della caratteristica di pericolo H14 deve essere attribuita ai rifiuti secondo quanto previsto dal CLP (Regolamento CE/1272/2008).

L'applicazione delle procedure previste dalle suddette norme pone numerosi problemi inerenti la preparazione del campione di rifiuto e l'esecuzione dei saggi ecotossicologici.

La metodologia EN 14735/EN 12457-2 [14 e 15], utilizzata precedentemente per i rifiuti e consolidata attraverso un interconfronto internazionale [10] [2], non può essere adeguata ai limiti di riferimento ADR espressi in mg/L e, d'altra parte, le porzioni di prova molto piccole ( $\leq 100$  mg/L) previste dall'applicazione dell'ADR potrebbero risultare poco rappresentative del campione di rifiuto analizzato [Paina et al., 2012 [13]; Conti et al., 2012 [4]].

Per ottemperare ai requisiti previsti dal citato Regolamento e sulla base dei risultati di uno studio di fattibilità condotto dal Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA su un'ampia gamma di rifiuti (2012-2013), è stata messa a punto una nuova procedura che prevede la produzione di singoli estratti acquosi (Water-Accommodated Fractions, WAFs) di rifiuto a differenti concentrazioni (esprese come loading rate) [OECD, 2000 [11]; OECD 2001 [12]; ECETOC 1996 [3]; ECHA 2012 [6], GHS].

Allo scopo di definire i parametri di ripetibilità e riproducibilità della procedura di preparazione dei WAFs di rifiuto, il Servizio ha condotto uno studio collaborativo (ISPRA SCO07) mediante l'esecuzione di saggi ecotossicologici con Alghe [*Pseudokirchneriella subcapitata*] e Crostacei [*Daphnia magna*]. La procedura è stata applicata limitatamente alla preparazione di un estratto acquoso con loading rate pari a 100 mg/L [test limite].

Vengono presentati i risultati complessivi dello studio ISPRA SCO07 cui hanno aderito 21 laboratori ARPA/APPA e 3 laboratori privati.

Keywords: ecotossico, rifiuto, H14, saggi ecotossicologici, WAFs.

## **Introduzione**

Per rispondere ai nuovi criteri ADR/CLP la metodologia di preparazione del campione di rifiuto, da sottoporre ai saggi, deve essere modificata rispetto alla procedura regolata dalle norme UNI EN 14735 e UNI EN 12457-2. In particolare sono stati presi in considerazione due aspetti in primo luogo, la determinazione della quantità di campione minimo da prelevare al fine di poter garantire la sua rappresentatività [1], in secondo luogo, poiché i metodi di riferimento (CE/440/2008) dei saggi ecotossicologici prevedono la possibilità di effettuare un test limite a 100 mg/L e questo valore rappresenta il limite della categoria “cronico 3” del CLP da applicare ai rifiuti, è stata analizzata l'applicazione di un test limite a 100 mg/L come screening preliminare di tossicità. Questo, allo scopo di limitare quanto più possibile l'esecuzione dei saggi definitivi che richiedono il calcolo del valore di LC/EC/ErC50. Infatti, se i test limite risultano negativi il rifiuto può immediatamente essere classificato come non ecotossico [4].

Gli aspetti sopra menzionati sono stati oggetto di uno studio di fattibilità, eseguito presso i laboratori del Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA, su un'ampia gamma di rifiuti (2012-2013). A valle di questo studio è stata, quindi, messa a punto una procedura per la preparazione dei campioni di rifiuto da sottoporre a saggi ecotossicologici. Tale procedura (OECD, 2000; OECD 2001; ECETOC 1996; ECHA 2012), prevede la produzione di un estratto acquoso (Water-Accommodated Fractions) di rifiuto con loading rate di 100 mg/L e l'esecuzione di saggi ecotossicologici con alghe e crostacei. Il loading rate è il rapporto esistente, in mg/L, tra il campione di prova e un volume noto di liquido. Esso esprime la concentrazione dell'estratto acquoso e viene considerato analogo alla concentrazione nominale di una soluzione.

Sulla base di tali premesse e nell'ambito della Pianificazione 2014-2015 per l'organizzazione di confronti interlaboratorio del sistema ARPA/APPA, ISPRA (Servizio Metrologia Ambientale) ha organizzato lo “Studio collaborativo ecotossicologico su lisciviato di rifiuto mediante saggi con *P. subcapitata* e *D. magna*”, denominato ISPRA SC007.

Lo studio collaborativo (SC) ha avuto lo scopo di definire i parametri di ripetibilità e riproducibilità della procedura di misurazione comprendente la preparazione di estratti acquosi di rifiuto (WAFs) con loading rate pari a 100 mg/L da un rifiuto solido (materiale di prova distribuito da ISPRA come materiale di riferimento) e la successiva esecuzione di test ecotossicologici con diversi sistemi di saggio: alghe d'acqua dolce della specie *Pseudochirckneriella subcapitata* e crostacei d'acqua dolce della specie *Daphnia magna*.

E' stato predisposto uno specifico protocollo per l'esecuzione dello studio ISPRA SC007 inclusivo di tre Procedure Operative Standard (POS) relative alla preparazione degli estratti acquosi (WAFs), al saggio di inibizione della crescita di alghe verdi monocellulari e al saggio acuto con il crostaceo *Daphnia magna*.

## **Materiali e metodi**

### *Laboratori partecipanti*

Allo studio collaborativo hanno aderito 25 laboratori: 22 laboratori ARPA/APPA (individuati dall'organizzatore dello studio collaborativo e dalla Rete dei Referenti ARPA/APPA a supporto dell'organizzazione dei confronti interlaboratorio) e 3

laboratori privati, tutti esperti nella esecuzione di saggi ecotossicologici con *P. subcapitata* e *D. magna*.

#### *Materiale di Riferimento*

Il materiale di prova distribuito ai laboratori è stato prodotto come materiale di riferimento ISPRA RM050 dal Servizio Metrologia Ambientale – ISPRA. ISPRA RM050 è costituito da un rifiuto (suolo contaminato) contenente elevate concentrazioni di elementi in tracce (metalli), proveniente da un'area industriale del Centro Italia. Esso è stato preparato ad una granulometria  $\leq 250 \mu\text{m}$  (distribuzione cumulativa  $> 95\%$ ), verificata mediante granulometro laser Helos Laser Particle Size Analyser (Sympattech) e, successivamente, omogeneizzato mediante agitazione. Il materiale, in unità di circa 2 g, è stato confezionato in contenitori di polietilene da 50 mL con tappo a vite. Sono state condotte prove finalizzate a valutare il grado di omogeneità delle unità prodotte.

#### *Sistemi di Saggio*

Per il test algale, il sistema di saggio è costituito dalla specie algale monocellulare d'acqua dolce: *Pseudokirchneriella subcapitata*. I laboratori sono stati lasciati liberi di scegliere se utilizzare per la prova colture algali di *P. subcapitata* presenti nel proprio laboratorio o le microalghe immobilizzate in matrice (alginates beads).

Per il test con il crostaceo *Daphnia magna*, il sistema di saggio è costituito da neonati nati da meno di 24 ore. I laboratori sono stati lasciati liberi di scegliere se utilizzare per la prova organismi provenienti da allevamenti presenti nel proprio laboratorio o derivanti da forme criptobiotiche (efippi).

#### *Metodi di saggio*

Il saggio algale con la specie d'acqua dolce *P. subcapitata* è stato eseguito dai laboratori secondo il metodo ISO 8692:2012[9].

Il saggio acuto con il crostaceo d'acqua dolce *D. magna* è stato eseguito dai laboratori secondo il metodo UNI EN ISO 6341: 2013 [16].

#### *Disegno sperimentale*

La prova richiesta ai laboratori prevedeva:

- a) la preparazione, dal materiale ISPRA RM050, di un estratto acquoso con loading rate di 100 mg/L;
- b) l'esecuzione, sull'estratto acquoso, di un saggio con la specie algale *P. subcapitata* per la determinazione dell'inibizione di crescita (I<sub>r</sub> %) dopo  $72 \pm 2$  ore e di un saggio con il crostaceo *D. magna* per la determinazione della percentuale di immobili/morti dopo 24 e 48 ore.

Ogni laboratorio doveva eseguire la prova per cinque volte.

Nella figura 1 è riportato lo schema sperimentale a titolo esemplificativo.

Almeno un test con un tossico di riferimento a scelta dei laboratori doveva essere eseguito con entrambi i sistemi di saggio per valutarne la sensibilità.

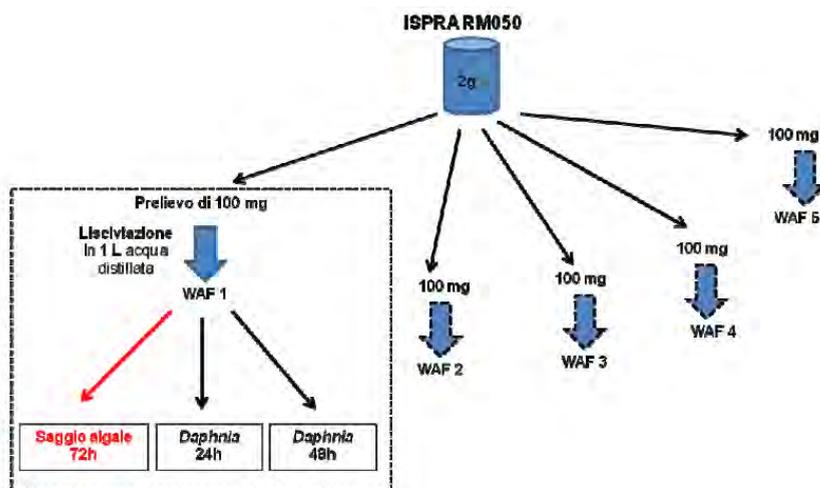


Figura 1 - Schema sperimentale

### Statistica

I valori di ripetibilità e riproducibilità della procedura di misurazione sono stati calcolati in accordo alla norma ISO-5725-parte 2 [8], previa applicazione dei test di Grubb e Cochran per la verifica di valori dubbi (struggler) e anomali (outlier) sia per le medie che per le varianze (intra-laboratorio). Sono stati inoltre eseguiti i test secondo la statistica  $h$  e  $k$  (Mandel), per valutare graficamente la consistenza statistica dei risultati dei laboratori (intra e tra laboratorio). La procedura di calcolo di ripetibilità ( $S_r$  %) e riproducibilità ( $S_R$  %) si basa su un processo iterativo che mira ad escludere dal calcolo finale degli scarti tipo di ripetibilità e riproducibilità i risultati dei laboratori che siano considerati, sulla base dei test suddetti, dubbi e/o anomali.

L'insieme dei risultati forniti dai laboratori hanno costituito la base su cui calcolare lo scarto tipo di ripetibilità e di riproducibilità per i sistemi di saggio applicati al materiale di prova.

### Risultati

Su 25 laboratori che hanno inviato la scheda di adesione allo studio collaborativo SC007, 23 laboratori hanno restituito i risultati.

Tabella 1. Misure di pH e conduttività effettuate dai laboratori sugli estratti acquosi (WAF) appena preparati e dopo correzione osmotica: valori medi e variabilità

	WAF appena preparato		Dopo correzione osmotica		
			Saggio algale	Saggio con Daphnia	
	pH1WAF	Cond1WAF $\mu\text{S}/\text{cm}$	pH2WAF	pH2WAF	Cond2WAF $\mu\text{S}/\text{cm}$
Medie	4,22	69,71	7,49	7,32	626
ST	0,32	17,49	0,54	0,39	114
STM	0,03	1,63	0,05	0,04	10,68
CV%	7,64	25,09	7,27	5,35	18,28

I 23 laboratori hanno preparato i 5 estratti acquosi e li hanno caratterizzati come previsto dallo studio. I valori medi di tutte le misure effettuate (n = 115) dai laboratori sugli estratti acquosi (prima e dopo la correzione osmotica) e la variabilità associata, espressa come scarto tipo (ST), scarto tipo della media (STM) e coefficiente di variazione percentuale (CV%) sono mostrati nella tabella 1.

In merito al saggio acuto con *Daphnia magna*, la quasi totalità dei laboratori (22/23) ha eseguito i test acuti nel rispetto dei criteri di validità stabiliti dalla norma e presi in considerazione nel presente studio. Il laboratorio che non ha rispettato questi criteri è stato escluso dall'elaborazione statistica dei risultati

Come mostrato in tabella 2, i valori medi delle percentuali di effetto dopo esposizione a 24 e 48 ore, calcolati sui risultati di 22 laboratori (110 misure), hanno evidenziato una tossicità finale inferiore al livello previsto per il controllo (10%) in entrambi i periodi espositivi.

Tabella 2 - Valutazione di tossicità con *Daphnia* (22 laboratori; 110 misure)

% effetto 24 h	CV %	% effetto 48 h	CV %
1,82	137,51	8,26	96,71

Nel caso del test con il crostaceo *Daphnia magna*, l'elaborazione statistica, con il calcolo della ripetibilità e riproducibilità, non è stata eseguita poiché i valori sono stati tali da rendere non applicabili le procedure in accordo alla norma ISO-5725-parte 2.

In merito al saggio con l'alga *P. subcapitata*, 21/23 laboratori hanno eseguito il test nel rispetto dei criteri di validità stabiliti dalla norma e presi in considerazione nel presente studio. In figura 2 sono riportati graficamente i valori medi di Ir% con associato scarto tipo, per ciascun laboratorio che ha rispettato i criteri di validità del saggio algale. L'elaborazione statistica secondo ISO 5725-2 dei risultati ha messo in evidenza l'esistenza di un outlier che è stato quindi eliminato dal calcolo degli scarti tipo di ripetibilità e riproducibilità. In tabella 3 sono mostrati i risultati di valore medio di Ir%, e gli scarti tipo di ripetibilità e riproducibilità ottenuti su 20 laboratori.

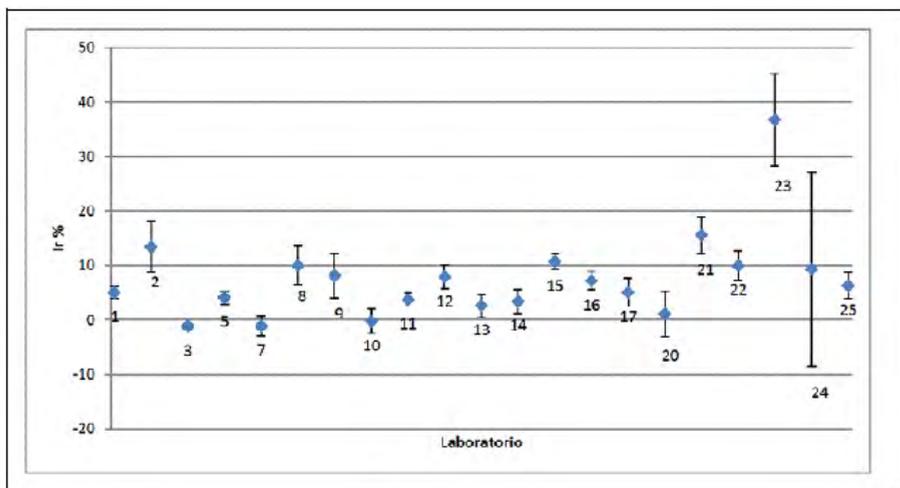


Figura 2 - Valori medi di Ir % con associato scarto tipo

Tabella 3 - Ripetibilità e Riproducibilità del Test algale (n = 20)

Valore medio (Ir %)	Scarto tipo di ripetibilità percentuale (Sr %)	Scarto tipo di riproducibilità percentuale (SR %)
6,08	78	104

### Discussione

Benchè lo studio abbia comportato l'utilizzo di un materiale di riferimento come rifiuto, sia stato effettuato da laboratori con documentata esperienza nel campo dell'ecotossicologia e il metodo di saggio, come confermato dal rispetto dei criteri di validità, sia stato applicato correttamente, i valori di ripetibilità (Sr %) e riproducibilità (SR %) delle misure algali sono risultati molto elevati. Non esistendo termini di confronto relativi a misure ripetute con campioni di rifiuto, quale quello utilizzato nel presente studio collaborativo, a titolo puramente indicativo è stato assunto come riferimento il limite massimo di variabilità del 30%, indicato dall'Environment Canada (2005) [7] e valido per misure ripetute con tossici di riferimento. Tenendo in debito conto le diversità dei parametri posti a confronto, quest'ultimo risulta di gran lunga superato.

Poiché i laboratori hanno lavorato secondo un metodo normato (ISO 8692:2012) e nel rispetto dei criteri di validità del saggio, i valori di ripetibilità e riproducibilità risultante dallo studio possono essere ragionevolmente attribuiti all'applicabilità della nuova procedura di preparazione del campione di rifiuto, proposta per ottemperare alle richieste normative ADR/CLP. Queste ultime, infatti, impongono da un lato, la preparazione di singoli estratti acquosi per ogni concentrazione da utilizzare (compresa tra 1 a 100 mg), e dall'altro, una modifica del rapporto liquido/solido (L/S), che passa da 1:10 (95±5 grammi in 1 litro) della precedente metodologia (UNI EN 147356 e UNI EN 12457-2) all'attuale 1:10000 (100 milligrammi in 1 litro).

Il problema del rapporto L/S nel caso della preparazione del campione di rifiuto da sottoporre ai saggi ecotossicologici era stato già ampiamente esaminato a livello Europeo attraverso l'istituzione di gruppi di lavoro ad hoc (CEN TC 292: WG2

Leaching test procedures e WG6 Basic characterization tests for leaching behaviour]. Gli studi, preparatori alla stesura della normativa UNI EN 14735 e UNI EN 12457-2 e riguardanti l'impiego di differenti rapporti L/S, avevano individuato, come ottimale, il rapporto L/S 1:10 nel caso di campioni di rifiuto preparati per l'esecuzione di saggi ecotossicologici con organismi acquatici.

D'altra parte, il rapporto L/S non costituisce un aspetto trascurabile nella determinazione dell'ecotossicità di un rifiuto, perché le concentrazioni delle specie inquinanti rilasciate, variano in funzione del rapporto stesso [5].

Il secondo aspetto che sembra rilevante è costituito dalle quantità di rifiuto che la normativa ADR/CLP impone di prelevare e che possono variare da 1 a 100 milligrammi. Il problema della rappresentatività del campione è stato affrontato applicando l'equazione di Gy. Rispetto alla metodologia precedentemente utilizzata (UNI EN 14735 e UNI EN 12457-2) che prevedeva l'utilizzo di un campione di  $\leq 4$  mm, il materiale RM050 è stato ridotto, conformemente alle simulazioni effettuate con l'equazione suddetta, ad una granulometria  $\leq 250$   $\mu\text{m}$  (valida per un prelievo di 100 mg di rifiuto). Per quantità di rifiuto al di sotto di 100 mg, è necessario apportare ulteriori riduzioni della granulometria fino a 125-90  $\mu\text{m}$ . Poiché, come è noto, i rifiuti sono spesso composti da materiali differenti e con diverse granulometrie, la necessità di effettuare tali riduzioni granulometriche può complicare molto il processo di pretrattamento dei campioni.

## **Conclusioni**

In merito al saggio acuto con il crostaceo *D. magna*, non è stato possibile effettuare le elaborazioni statistiche previste, perché, una volta accertata, dalle misure eseguite dai laboratori, l'assenza di effetto, soprattutto nell'esposizione a 24 ore, la base statistica risultava del tutto inadeguata all'applicazione delle procedure di calcolo della ripetibilità e della riproducibilità. In ogni caso, questo saggio ha evidenziato una tossicità finale inferiore al livello previsto per il controllo (10%) in entrambi i periodi espositivi.

Relativamente al saggio con l'alga *P. subcapitata* la valutazione finale di tossicità, calcolata su 20 laboratori ed espressa come inibizione del tasso di crescita (Ir %) dopo 72 ore, è risultata pari al 6%. I valori di ripetibilità (Sr %) e riproducibilità (SR %) delle misure algali sono risultati molto elevati. Possiamo concludere che i valori di ripetibilità (78 %) e riproducibilità (104 %) ottenuti nel saggio algale sono tali da rendere complessa l'applicabilità della procedura proposta, e impongono un'ulteriore riflessione sul significato e sulle modalità di preparazione dei campioni di rifiuto, nonché sulla tipologia di saggi ecotossicologici da utilizzare per la determinazione della caratteristica di pericolo H14, sulla base delle richieste ADR/CLP.

## **Bibliografia**

- [1] Bonato T., D. De Dominicis, F. Loro e L. Tomiato Pericolosità per l'ambiente: l'attribuzione ai rifiuti. Ambiente & Sicurezza, 10:74-81 - 2012.
- [2] CEN/TS 14405 Characterization of waste - Leaching behaviour tests - Up-flow percolation test (under specific conditions) - 2004.
- [3] ECETOC Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. Monograph n° 26 - 1996.

- [4] Conti D., S. Balzamo, A. Paina, A. Pati, C. Martone, V. Bellaria Valutazione della pericolosità per l'ambiente dei rifiuti (H14): definizione della procedura analitica. Atti Giornate di studio 5a Edizione "Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate" - Livorno 7-9 novembre 2012 - pp 201 - 2012.
- [5] Conti D., A. Paina, S. Balzamo, M. Belli Batterie di test per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti: stato dell'arte. Rapporti ISPRA 156/2012 - 2012.
- [6] ECHA Guidance on Application of CLP - 2012.
- [7] Environment Canada [2005] "Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests" EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments).
- [8] ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- [9] ISO 8692:2012 Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- [10] Moser M., and J. Römcke Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test. Ed. Springer - 2009.
- [11] OECD [2000] Series on Testing and Assessment. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Number 23.
- [12] OECD [2001] Series on Testing and Assessment. Guidance Document on the Use of the Harmonised System for the Classification of Chemicals which are Hazardous for the Aquatic Environment. Number 27.
- [13] Paina A., D. Conti, S. Balzamo, A. Pati, C. Martone, V. Bellaria I rifiuti e la pericolosità per l'ambiente (H14): evoluzione normativa e quadro di riferimento. Atti Giornate di studio 5a Edizione "Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate" - Livorno 7-9 novembre 2012 - pp194 - 2012
- [14] UNI EN 14735 Caratterizzazione dei rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove eco tossicologiche - 2005.
- [15] UNI EN 12457-2 (2004) Caratterizzazione dei rifiuti - Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi- Parte 2: prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10L/Kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm [con o senza riduzione delle dimensioni].
- [16] UNI EN ISO 6341: 2013 Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta.

# L'ANALIZZATORE EASYCHEM TOX PER IL SAGGIO DI TOSSICITÀ ACUTA CON BATTERI BIOLUMINESCENTI (*VIBRIO FISCHERI*): VERIFICA DEI CRITERI DI PRECISIONE E VALIDITÀ

di A. Paina<sup>a</sup>, C. Martone<sup>b</sup>, A. Pati<sup>c</sup>, S. Barbizzi<sup>d</sup>, S. Rosamilia<sup>e</sup>, O. Faraponova<sup>f</sup>, D. Conti<sup>g</sup>, S. Balzamo<sup>h</sup>

ISPRA - andrea.paina@isprambiente.it<sup>a</sup>; ISPRA - cristina.martone@isprambiente.it<sup>b</sup>;  
ISPRA - alessandra.pati@isprambiente.it<sup>c</sup>; ISPRA - sabrina.barbizzi@isprambiente.it<sup>d</sup>;  
ISPRA - silvia.rosamilia@isprambiente.it<sup>e</sup>; ISPRA - olga.faraponova@isprambiente.it<sup>f</sup>;  
ISPRA - daniela.conti@isprambiente.it<sup>g</sup>; ISPRA - stefania.balzamo@isprambiente.it<sup>h</sup>

---

**Abstract.** Il saggio con *Vibrio fischeri* è uno dei metodi più diffusi ed utilizzati per la valutazione della tossicità acuta delle acque e di campioni acquosi (acque di scarico, lisciviati, ecc.). Il test è caratterizzato da una notevole semplicità di esecuzione, rapidità di risposta ad un costo relativamente contenuto. In questo lavoro abbiamo verificato l'efficienza e la precisione di un nuovo analizzatore, l'EasyChem Tox, caratterizzato da elevata automazione, rapidità di esecuzione in tutte le fasi del test, associata ad un'efficienza uso dei reagenti (il campione minimo da analizzare è di 320 µL) ed elevata produttività. La lettura della bioluminescenza con frequenza fino a 45<sup>sec</sup>, l'esecuzione in duplicato di ogni singola diluizione del campione e la restituzione grafica del risultato in tempo reale (figura 1 e 2), consente di verificare l'andamento della risposta batterica nel corso del test. L'analizzatore è stato testato utilizzando quattro sostanze tossiche; bicromato di potassio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), solfato di zinco (ZnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O), 3,5 Diclorofenolo (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>O) e Cloruro di cadmio (CdCl<sub>2</sub>\*2,5H<sub>2</sub>O). I risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente ai fini della determinazione delle ripetibilità e riproducibilità del sistema. Ulteriori prove sono state condotte confrontando i risultati del sistema EasyChem Tox con il sistema Microtox®. Il sistema EasyChem Tox ha mostrato una notevole precisione, un'ottima versatilità e semplicità d'uso combinata ad un'elevata produttività.

Keywords: analizzatore, saggio con batteri bioluminescenti, tossicità acuta, criteri di validità.

## Introduzione.

Il test Microtox®, grazie al suo ampio spettro di sensibilità a diversi composti sia organici che inorganici, è ampiamente utilizzato come strumento di screening adatto a determinare la tossicità in ambiente acquatico attraverso l'analisi di campioni di svariata origine e natura: acque di scarico, sedimenti, suoli e lisciviati di varia natura (percolati di discarica, estratti acquosi da rifiuti solidi, ecc). Il limite principale di questo saggio è la relativa scarsa produttività potendosi eseguire un numero limitati di saggi per effetto sia dei volumi dei reagenti necessari all'esecuzione del test, sia dei tempi di esecuzione del saggio, vincolati questi, alla determinazione dell'end-point prestabilito (valore di EC a 5, 15 o 30<sup>min</sup>). Inoltre, nell'esecuzione del saggio con gli analizzatori ad oggi più diffusi sul mercato (Microtox, Lumistox), il contributo dell'operatore è fondamentale nel determinare la corretta esecuzione del test e il livello di riproducibilità dello stesso, aspetti fondamentali per una corretta interpretazione dei risultati. In questo studio sono state verificate le prestazioni dell'EasyChem Tox, un nuovo analizzatore discreto di bioluminescenza per

l'esecuzione di test cronici con batteri bioluminescenti. L'EasyChem Tox è caratterizzato da elevata automazione di tutte le fasi di saggio associate ad un efficiente uso di reagenti e buffer. La lettura della bioluminescenza ogni 40<sup>sec</sup> consente di monitorare in tempo reale l'andamento del test e la risposta batterica; il software che gestisce lo strumento restituisce un elaborato grafico (figura 1 e 2) in cui si può osservare la risposta dell'organismo, in termini di bioluminescenza emessa, lungo tutta la durata del saggio. In questo lavoro abbiamo verificato le prestazioni dell'analizzatore Easychem Tox in termini di ripetibilità e di ripetibilità intermedia oltre a verificare i risultati in relazione ai criteri di validità della EN 11348-3:2009 [1]. Inoltre, abbiamo comparato i valori di tossicità ottenuti con Easychem Tox con quelli rilevati con Microtox® M500, utilizzando batteri liofilizzati in formulazione commerciale conservati a -20°C (Modern Water).

## Materiali e metodi.

I batteri utilizzati sono della specie *Vibrio fischeri* (freeze-dried bacteria, NRRL B-11177) prodotti in formulati commerciali liofilizzati (Microtox®, Modern Water. Reagent A, Systema) e conservati a -20°C fino al momento dell'uso. Gli analizzatori utilizzati sono il Microtox® M500 (Modern Water) e l'EasyChem Tox (Systema, figura 3). Nelle prove per la determinazione della ripetibilità, sono stati utilizzati i batteri, i buffer, la soluzione di riattivazione e le soluzioni di controllo prodotti e forniti dalla Systema. La verifica di comparabilità dei risultati tra EasyChem Tox e Microtox® M500, è stata condotta utilizzando batteri *V. fischeri* liofilizzati, buffer osmotico, diluente e soluzione di riattivazione Microtox®, prodotti e commercializzati dalla Modern Water. I reagenti utilizzati nei saggi e le relative concentrazioni sono; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Panreac) 105,8mg/L, ZnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O (Panreac) 12,07mg/L, 3,5 Diclorofenolo (97%, Sigma-Aldrich) 7,01mg/L e CdCl<sub>2</sub>\*2,5H<sub>2</sub>O (Panreac) 100mg/L. Le modalità operative e i criteri di validità sono quelli definiti dalla EN11348-3[1]. Le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua ultrapura con conducibilità 0.054µS/cm. La vetreria utilizzata è stata preventivamente pulita con un doppio lavaggio con detergente acido e basico e un risciacquo in acqua demineralizzata a 75°C.



Figura 1 – EasyChem Tox; Rapporto di saggio di un test con ZnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O (*V. fischeri*, Modern Water)

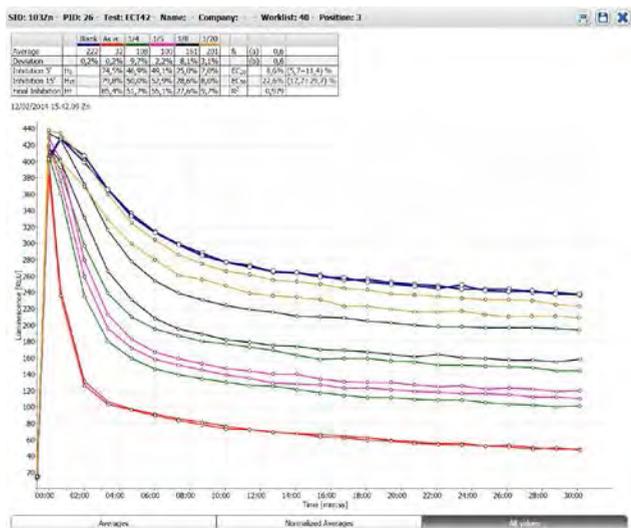


Figura 2 – EasyChem Tox; Rapporto di saggio di un test con  $ZnSO_4 \cdot H_2O$  (V. fischeri, Systea).

Per la verifica di ripetibilità sono stati utilizzati i valori di  $EC_{50}$  a 30<sup>min</sup> ottenuti da 54 saggi effettuati su ciascun tossico; ciascun saggio è stato condotto con cinque concentrazioni e un controllo in duplicato. Le prove sono state eseguite per tre giorni consecutivi e ripetute nelle tre settimane a seguire. In ciascuna settimana il medesimo operatore ha eseguito tutte le fasi di saggio (riattivazione dei batteri, preparazione delle soluzioni ed esecuzione dei saggi).



Figura 3 – L'analizzatore EasyChem Tox; sono visibili il comparto dei reagenti (a sx), dei campioni (al centro in basso), il braccio con l'ago per il trasferimento dei reagenti (al centro in alto) e il vano per la lettura dei campioni (a dx) con la torre di lavaggio delle cuvette. In basso a destra un particolare del comparto di lettura dei campioni

con, sullo sfondo, uno dei quattro rack di cuvette test e, a sx la torre di lavaggio delle cuvette

## Risultati e discussione.

Elaborazione statistica dei risultati: determinazione della ripetibilità ristretta ed intermedia.

I risultati ottenuti utilizzando batteri *Syستا*, evidenziano una generale tendenza di maggior sensibilità della risposta batterica; i valori di EC<sub>50</sub> a 30<sup>min</sup> registrati, infatti, sono inferiori a quelli riportati all'Allegato C della EN11348-3:2009. Nel caso del cromo il valore medio è di 9,9±1,4mg/L con un CV=15%. Per il DCP il valore medio è 2,61±0,33mg/L con un CV=13%. Nel caso dello zinco il valore medio è 1,04±0,35mg/L con un CV=34%. Per il cadmio il valore medio è 7,2±2,2mg/L con un CV=30%. Per quanto riguarda la differenza percentuale tra i valori dei duplicati di controllo (punto 11 della EN 11348-3:2009), la media dei valori registrati in tutti i test effettuati (216 test) è inferiore al limite previsto dalla norma tecnica di riferimento; il 75% dei valori è inferiore al limite del 3%.

Nelle prove di comparazione sono stati utilizzati i valori di EC<sub>50</sub> a 30<sup>min</sup>, ottenuti da saggi eseguiti con cinque concentrazioni più un controllo in duplicato, per i test effettuati con EasyChem Tox, e senza repliche di controllo, per i test eseguiti con Microtox® M500. I valori relativi al fattore di correzione medio a 30<sup>min</sup> ( $f_{kz}$  - è il rapporto tra l'intensità luminosa dei batteri misurata dopo l'aggiunta della soluzione di controllo a 15 o 30 minuti e l'intensità luminosa prima dell'aggiunta della stessa soluzione ed espresso come media dei fattori di correzione per le due repliche del controllo) sono risultati più critici; il 31% di tutti i valori registrati è inferiore al limite minimo previsto dalla EN11348-3 [0,6]. Il calcolo di ripetibilità e ripetibilità intermedia dell'EasyChem Tox, in conformità ai criteri definiti dal Vocabolario Internazionale di Metrologia[2], è stata condotta elaborando statisticamente i risultati ottenuti da una serie di 54 test effettuati su ciascuna sostanza tossica. I valori di ripetibilità ristretta ed intermedia (tabella 1) sono stati ottenuti applicando il test ANOVA. I valori di ripetibilità, valutati in riferimento a quanto riportato da Environment Canada[3] come "ragionevoli" (30%) e "preferibili" (20%), sono molto buoni per quanto riguarda la ripetibilità con il DCP e la ripetibilità ristretta con cromo, e buoni per la ripetibilità intermedia con cromo.

Tabella 1 - stima della ripetibilità del sistema EasyChem Tox

	<i>Cd</i>	<i>Cr</i>	<i>Zn</i>	<i>DCP</i>
<i>ripetibilità ristretta [%]</i>	<i>30</i>	<i>14</i>	<i>34</i>	<i>13</i>
<i>ripetibilità intermedia [%]</i>	<i>37</i>	<i>24</i>	<i>38</i>	<i>18</i>

Per quanto riguarda il cadmio e lo zinco i valori sono più critici se si considerano in rapporto al riferimento riportato in Environment Canada. Tuttavia, per quanto riguarda il cadmio, le valutazioni sono un po' differenti se si prendono a riferimento i risultati del circuito ISPRA-IC20[4] del 2011 a cui hanno partecipato 45 laboratori delle Agenzie regionali e provinciali per l'ambiente (ARPA/APPA). Infatti, pur considerando che i risultati dalle prove eseguite hanno un CV 30%, il 69% dei valori rilevati rientra nei limiti stabiliti per il circuito ISPRA-IC20 (8,6±2,7mg/L). Per quanto riguarda lo zinco invece, sempre in riferimento a quanto riportato in Environment Canada, i valori sono risultati abbastanza elevati.

Studio di comparazione dei risultati di Microtox® M500 ed EasyChem Tox.

In questa fase sono stati comparati, utilizzando batteri Microtox®, i valori di  $EC_{50}$  a 30<sup>min</sup>, ottenuti con  $K_2Cr_2O_7$  e  $ZnSO_4 \cdot H_2O$ . In figura 4 sono riportati, in forma grafica, i valori di  $f_{kt}$  a 30<sup>min</sup> dei controlli nei saggi effettuati durante le prove di comparazione. Nelle prove sono stati utilizzati due lotti batterici differenti (lotto 13G4098 e 14A4003) testati su entrambi gli analizzatori, sia in giorni differenti che contemporaneamente. I valori registrati rientrano per il 99% entro i limiti di validità riportati nella EN11348-3. La media e lo scarto tipo dei valori di  $f_{kt}$  registrati dai due strumenti sono differenti, quindi si è verificata la probabilità che tale differenza sia imputabile ad un effetto casuale. Applicando il “test t” di Student il valore è risultato significativo (<0.05) e quindi le piccole differenze osservate non sono esclusivamente dovute al caso. Tuttavia, se l’analisi statistica mette in rilievo questa differenza, è stato già osservato che, praticamente, tutti i valori registrati rientrano nei limiti di validità della norma di riferimento. Inoltre possiamo osservare (figura 5) che, considerando lo scarto tipo in rapporto alla media dei due gruppi di valori, vi è un’area di sovrapposizione assai ampia; i due gruppi di valori sono “compatibili” in senso metrologico in quanto “il valore assoluto della differenza di una qualsiasi coppia di valori misurati, derivanti da due risultati di misura differenti, è minore di un certo multiplo dell’incertezza tipo associata a tale differenza” (2.47 - CEI UNI 70099:2010-04).

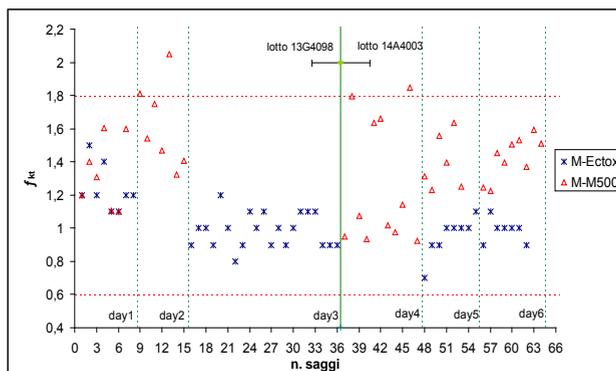


Figura 4 - Valori di  $f_{kt}$  a 30min con batteri Microtox sugli analizzatori EasyChem Tox (M-Ectox) e Microtox® M500 (M-M500)

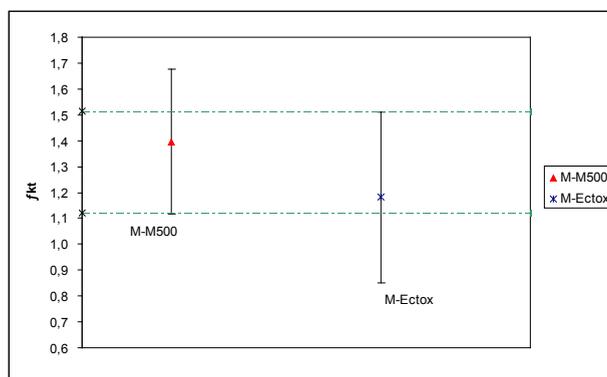


Figura 5 - Valori medi di  $f_{kt}$  a 30min e scarto tipo con batteri Microtox sugli analizzatori EasyChem Tox (M-Ectox) e Microtox® M500 (M-M500)

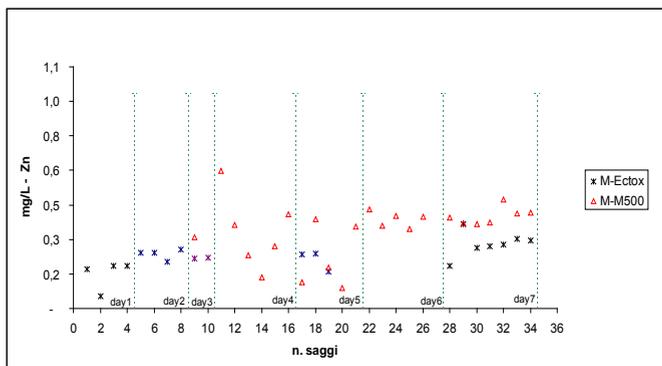


Figura 6 – Valori di EC<sub>50</sub> a 30<sup>min</sup> con zinco e batteri Microtox sugli analizzatori EasyChem Tox (M-Ectox) e Microtox® M500 (M-M500)

In figura 6 sono riportati i valori di EC<sub>50</sub> a 30<sup>min</sup> ottenuti con zinco, su entrambi gli strumenti; I saggi sono stati effettuati in giorni (day) non consecutivi e con batch batterici differenti tranne per i giorni 3, 5 e 7 in cui sono stati utilizzati batteri provenienti dallo stesso batch su entrambi gli strumenti. I valori ottenuti con zinco (EasyChem Tox 0,24±0,07mg/L e con Microtox® M500 0,37±0,12mg/L) sono risultati molto inferiori a quelli di riferimento riportata nella EN11348-3 (2,17±0,73mg/L). In sostanza i batteri mostrano una elevata sensibilità allo zinco. I valori medi e lo scarto tipo dei valori di EC<sub>50</sub> a 30min ottenuti dai due strumenti, sono leggermente differenti. Il risultato del “test t” di Student, è significativo (<0.05), quindi le piccole differenze osservate non sono esclusivamente casuali.

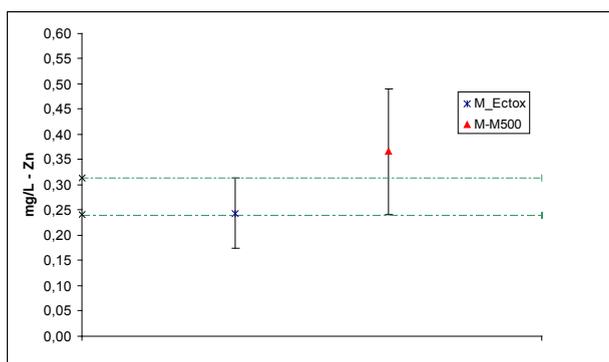


Figura 7 - Valori medi di EC<sub>50</sub> a 30<sup>min</sup> e scarto tipo con zinco e batteri Microtox sugli analizzatori EasyChem Tox (M-Ectox) e Microtox® M500 (M-M500)

Tuttavia, come è possibile osservare in fig. 7, considerando lo scarto tipo in rapporto alla media dei due gruppi di valori, vi è una significativa area di sovrapposizione e i risultati ottenuti sono compatibili metrologicamente.

Nella figura 8 sono riportati i valori di EC<sub>50</sub> a 30<sup>min</sup> con cromo ottenuti dai due strumenti insieme ai valori derivati dal circuito ISPRA-IC20. I valori hanno una distribuzione abbastanza ampia ma rientrano sostanzialmente nei limiti previsti dalla EN11348-3 e sono in linea con quelli ottenuti dai 42 laboratori partecipanti al circuito ISPRA-IC20. Anche in questo caso è stato effettuato un “test t” di Student per

rilevare l'eventuale distribuzione casuale dei valori ottenuti dai due strumenti; il valore non è significativo, quindi la distribuzione statistica dei risultati è casuale e quindi i due gruppi di valori sono paragonabili; inoltre, i valori ottenuti sono "compatibili" in senso metrologico.

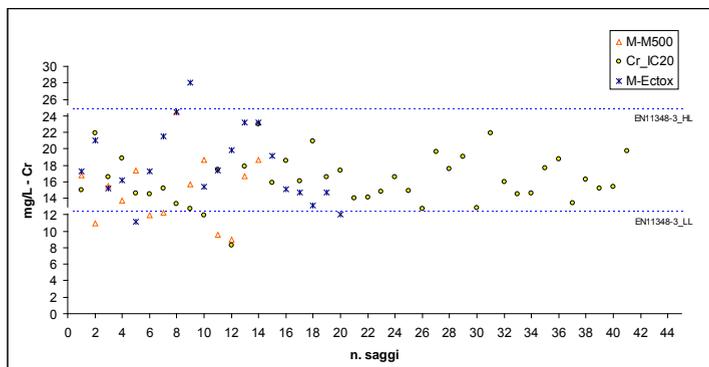


Figura 8 - Valori di  $EC_{50}$  a  $30^{th}$  con cromo e batteri Microtox (Modern Water) ottenuti con gli analizzatori EasyChem Tox (M-Ectox) e Microtox® (M-M500) e i valori derivati dal circuito ISPRA IC20 (Cr\_IC20)

## Conclusioni.

La ripetibilità del sistema EasyChem Tox è risultata buona per quanto riguarda cromo e DCP mentre i valori sono un po' elevati per quanto riguarda cadmio e soprattutto zinco (Tabella 1). Per il cadmio, tuttavia, i valori sono in linea con i limiti di attenzione stabiliti per il circuito ISPRA-IC20. Il valore di  $f_{12}$  è risultato il parametro più critico ed è molto probabilmente correlato non tanto alle modalità operative ed alle caratteristiche dello strumento, quanto alla risposta batterica in termini di sviluppo della bioluminescenza (figura 2). Relativamente alla comparabilità dei risultati ottenuti con EasyChem Tox rispetto a Microtox® M500, questa è risultata, limitatamente alle condizioni dei test, buona

I valori di  $f_{12}$  restituiti dai due strumenti in analoghe condizioni, sono compatibili in senso metrologico e in linea con i riferimenti della EN11348-3. La risposta al cromo dei due strumenti è comparabile essendo non significativo il "test t" di Student; inoltre i valori ottenuti sono in linea con i limiti di precisione della norma tecnica di riferimento. Per quanto riguarda la risposta allo zinco, si sono rilevati valori molto bassi rispetto ai limiti di precisione della EN11348-3; la valutazione statistica conferma che la distribuzione dei valori non è esclusivamente casuale, tuttavia, i due gruppi di valori sono compatibili in senso metrologico. Dal punto di vista gestionale l'analizzatore EasyChem Tox si è dimostrato molto performante grazie all'elevata automazione di tutte le fasi di saggio e all'utilizzo di volumi molto contenuti di reagenti e buffer (32  $\mu$ L è il volume di batteri da utilizzare). Lo strumento consente di effettuare fino a 45 test/h, che significa poter eseguire fino a 9 saggi completi - con 5 concentrazioni più un controllo in duplicato - ogni due ore. A queste caratteristiche si aggiunge poi una notevole semplicità di gestione insieme ad una flessibilità d'uso dello strumento molto elevata.

**Bibliografia.**

- [1] EN 11348-3:2009 - Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria
- [2] CEI UNI 70099:2010-04, International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM), 2010-04
- [3] Environment Canada EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments) "Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests
- [4] ISPRA- IC020" - Valutazione ecotossicologica di contaminazione delle acque mediante saggi di tossicità acuta con *Vibrio fischeri*". ISPRA, 2011.

# PROVE DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SUGLI STADI DI EMBRIONE E DI LARVA CON SACCO VITELLINO DEL DANIO ZEBRATO (*DANIO RERIO*) (OECD N. 212 E 236): MESSA A PUNTO DEI TEST IN PREVISIONE DELLA CERTIFICAZIONE BPL

di D. Palazzi, F. Savorelli, P. L. Trentini, G. Mirolo

ARPA Emilia-Romagna – sez. prov.le di Ferrara; dpalazzi@arpa.emr.it

---

**Abstract** - La normativa vigente relativa alla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (Direttiva 2010/63/UE recepita dal D.Lgs n. 26 del 04/03/2014 e Decisione 2012/707/UE) esclude dall'ambito di applicazione gli stadi di sviluppo di animali vertebrati incapaci di alimentarsi autonomamente e, in particolare per i pesci zebra, gli embrioni fino a 5 giorni dopo la fecondazione.

Tra i metodi elencati dal Regolamento n. 440/2008/CE (REACH), il Metodo C.15 – OECD 212/1998 prevede l'esecuzione di prove di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larva con sacco vitellino di varie specie ittiche, tra cui il *Danio rerio*.

Numerosi autori propongono il “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test “ (OECD 236/2013) come potenziale alternativa al test di tossicità acuta con pesci (OECD 203/1992). Infatti tale Metodo, specifico per la specie *Danio rerio*, prevede che il test si concluda dopo 96 ore con l'esposizione del solo stadio embrionale.

Nell'ottica della riduzione dell'impiego di vertebrati, il Centro di Saggio ITTIOLAB di ARPA ER-Ferrara, già certificato BPL per il Metodo C.1 – OECD 203, ha messo a punto un'affidabile tecnica di riproduzione controllata del pesce d'acqua dolce *Danio rerio*, che consente la realizzazione a domanda dei test che utilizzano embrioni.

Le prove preliminari con la sostanza di riferimento Cloruro di Sodio, eseguite in previsione della Certificazione BPL dei metodi, hanno prodotto risultati in linea con i dati bibliografici.

Keywords: metodi alternativi, FET, *Danio rerio*, tossicità acuta, certificazione BPL

## Introduzione

Tra gli obiettivi del Regolamento Comunitario REACH (Reg. CE 1907/2006 artt. 13 e 25) e delle normative vigenti relative alla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (Direttiva 2010/63/UE recepita dal D.Lgs n. 26 del 04/03/2014), vi è quello di sostituire, ridurre o migliorare la sperimentazione su animali, ricorrendo, ove possibile, a metodi alternativi ai test su animali vertebrati.

In particolare, il D.Lgs n. 26 del 04/03/2014 comprende tra gli “animali vertebrati” anche le forme larvali di specie ittiche capaci di alimentarsi autonomamente.

Tra i vari Metodi del Regolamento (CE) N. 440/2008 (REACH) necessari per la registrazione delle sostanze fabbricate o importate in quantitativi uguali o superiori a 100 tonnellate, è presente il Metodo C.15 – OECD 212/1998 che prevede l'esecuzione di prove di tossicità a breve termine utilizzando embrioni e larve ancora dotate di sacco vitellino di varie specie ittiche (elencate nelle Tabelle 1A e 1B). Tali stadi sono incapaci o non hanno ancora l'esigenza di alimentarsi autonomamente e

sono quindi potenzialmente esclusi dall'ambito di applicazione del D.Lgs n. 26 del 04/03/2014.

Riguardo la specie *Danio rerio*, la Decisione di esecuzione della Commissione 2012/707/UE per la trasmissione delle informazioni ai sensi della Direttiva 2010/63/UE afferma che, in condizioni di allevamento ottimali, i pesci zebra rientrano nell'ambito di applicazione a partire da 5 giorni dopo la fecondazione.

Numerosi autori propongono il "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test" (OECD 236/2013) come potenziale alternativa al test di tossicità acuta con pesci (OECD 203/1992). Infatti tale Metodo, specifico per la specie *Danio rerio*, prevede che il test si concluda dopo 96 ore con l'esposizione del solo stadio embrionale.

Pertanto, nell'ottica della riduzione dell'impiego di vertebrati, il Centro di Saggio ITTIOLAB di ARPA ER-Ferrara, già certificato in Buona Pratica di Laboratorio (BPL) per il Metodo C.1 - OECD 203 (Tossicità acuta per i pesci), ha messo a punto un'affidabile tecnica di riproduzione controllata del pesce d'acqua dolce *Danio rerio* o *Danio zebra* per l'esecuzione dei Metodi C.15 "Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrioni e di larve con sacco vitellino" e OECD 236 "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test", considerati entrambi possibili alternative all'utilizzo di animali vertebrati e quindi al test di tossicità acuta con giovanili di specie ittiche.

### ***Materiali e metodi***

#### Riproduzione controllata

Il CdS ITTIOLAB di ARPA-Ferrara mantiene e alleva gli adulti della specie *Danio rerio* in uno stabulario autorizzato dal Ministero della Salute, allo scopo di programmare e mettere in atto la riproduzione ogni volta che ve ne sia la necessità. La produzione controllata delle uova in laboratorio è una condizione essenziale per l'esecuzione dei Metodi C.15 e FET, in quanto entrambi prevedono l'inizio del test entro tempi molto ristretti (poche ore dalla fertilizzazione), condizione che può essere incompatibile con l'acquisto delle uova da fornitori esterni.

La riproduzione del *Danio rerio* è ottenuta mettendo a contatto gruppi di pesci maturi sessualmente all'interno di 3 vasche in plexiglass appositamente predisposte.

Queste vengono allestite alloggiando al loro interno un vassoio ricoperto con una griglia o con una rete a maglia grossa, per impedire ai pesci di cibarsi delle uova. Al fine di creare un ambiente più simile a quello naturale e per stimolare la deposizione delle uova, vengono fissati alla griglia/rete strutture in plastica che simulano la vegetazione acquatica. Le vasche acquario vengono riempite con circa 10 litri di acqua di allevamento fino a raggiungere un livello di almeno 10 cm al di sopra della griglia/rete. Il pomeriggio precedente la prevista deposizione, vengono introdotti in ciascuna vasca una decina di pesci costituiti da maschi e femmine nel rapporto di 2:1. Le vasche vengono sistemate in un termostato programmato alla temperatura di  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo di 12 ore di luce debole e 12 ore di buio. Il passaggio dal buio alla luce costituisce lo stimolo alla deposizione delle uova che avviene entro circa 30 minuti dall'accensione della luce. Dopo la rimozione dei pesci, si prelevano le uova emesse nei vassoi.

#### Metodo C.15 - OECD 212/1998 "Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrioni e di larva con sacco vitellino" e Metodo OECD 236/2013 "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test"

Il CdS ITTIOLAB di ARPA-Ferrara ha eseguito 3 test con entrambi i metodi utilizzando come sostanza di riferimento il Cloruro di Sodio (NaCl) e come organismo test la specie ittica *Danio rerio*.

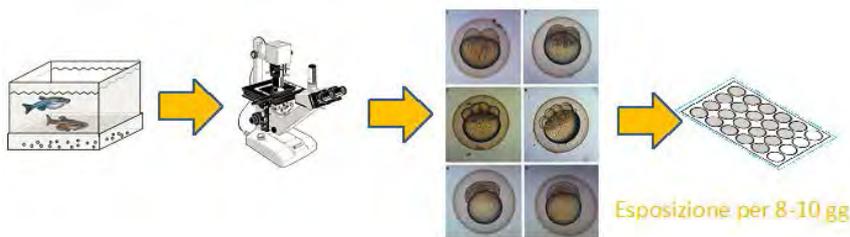
I motivi che hanno portato alla scelta del Danio zebra sono i seguenti:

- è una delle specie raccomandate dal Metodo C.15 ed è la specie obbligatoria del FET;
- è un pesce robusto, resistente e di piccola taglia (4 cm circa);
- la fecondazione delle uova è esterna;
- produce un numero elevato di uova non aderenti;
- si riproduce per tutto l'anno;
- l'embrione è trasparente e quindi facilmente osservabile al microscopio;
- ha uno sviluppo embrionale veloce: sono necessari tre giorni per passare dallo stadio di uovo a quello di larva.

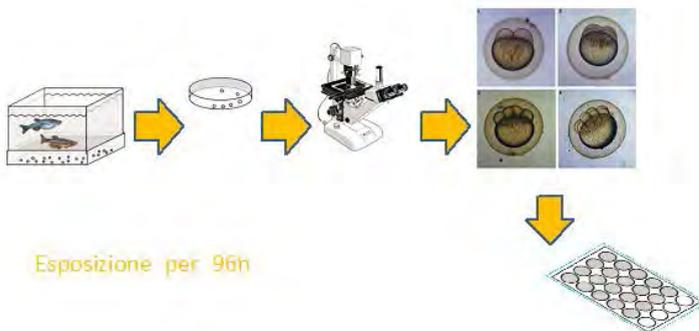
La procedura, comune ai due Metodi, consiste nell'esporre le uova appena fertilizzate alla sostanza di prova.

Secondo il Metodo C.15, le uova raccolte dal vassoio di deposizione vengono osservate al microscopio per la selezione: vengono scelte le uova fertilizzate ai primi stadi di divisione cellulare del blastodisco, e comunque entro lo stadio di gastrula, che nel *Danio rerio* si forma a circa 5 ore dalla fertilizzazione.

### METODO C.15 (Regolamento CE n. 440/2008)



### METODO OECD 236/2013 "FISH EMBRYO ACUTE TOXICITY (FET) TEST"



Per il FET l'inizio dell'esposizione deve avvenire entro lo stadio di 16 cellule di divisione del blastodisco, ossia entro 90 minuti dalla fertilizzazione. Le uova raccolte dal vassoio di deposizione sono quindi immediatamente pre-esposte alle diverse concentrazioni della sostanza in esame ed al controllo, in numero pari al doppio di

quello necessario per il test. Successivamente, vengono selezionate al microscopio le uova fertilizzate che non mostrano irregolarità nella divisione cellulare. In Tabella 1 e 2 sono riassunte le condizioni sperimentali applicate per l'esecuzione dei test ecotossicologici secondo i due Metodi sopra citati.

Tabella 1. Condizioni sperimentali dei test eseguiti secondo il Metodo C.15

Tipo di saggio	Semistatico con cambio della soluzione 3 volte/settimana a giorni alterni
Durata del saggio	8 giorni
Camere test	Piastre da 24 pozzetti
Volume soluz./pozzetto	2,5 ml
Organismo test	Specie ittica <i>Danio rerio</i>
N° uova esposte/replica	15 [1 uovo/pozzetto]
Alimentazione	Assente
Concentrazioni di NaCl saggate	0,00 - 1,25 - 2,50 - 5,00 - 10,00 - 20,00 g/L (Test 1 e 2) 0,00 - 1,50 - 3,00 - 6,00 - 12,00 - 24,00 g/L (Test 3)
N° repliche/concentraz.	3
Acqua di diluizione	Come da ISO 12890:1999
Temperatura esposizione	25±1°C
Fotoperiodo	12 ore luce: 12 ore buio
Endpoints osservati	<u>Mortalità</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• UOVO (perdita di traslucidità per coagulazione e/o precipitazione di proteine)</li> <li>• EMBRIONE (assenza di movimenti del corpo e/o del battito cardiaco, colorazione opaca)</li> <li>• LARVA (immobilità, assenza di movimenti respiratori e/o del battito cardiaco, colorazione opaca del sist. nervoso centrale, mancanza di reazione agli stimoli meccanici)</li> </ul> <u>Lunghezza totale delle larve a fine test</u>
Criteri di accettabilità	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O<sub>2</sub> disciolto tra 60 e 100% per tutta la dura del test</li> <li>• Temperatura entro ± 1,5 °C per tutta la durata del test</li> <li>• Sopravvivenza nel controllo alla schiusa ≥80%</li> <li>• Sopravvivenza nel controllo-post schiusa ≥90%</li> </ul>

Tabella 2. Condizioni sperimentali dei test eseguiti secondo il FET

Tipo di saggio	Semistatico con cambio della soluzione 3 volte/settimana a giorni alterni
Durata del saggio	96 ore
Camere test	Piastre da 24 pozzetti
Volume soluz./pozzetto	2 ml
Organismo test	Specie ittica <i>Danio rerio</i>
N° uova esposte/replica	1 [1 uovo/pozzetto]
Alimentazione	Assente

Concentrazioni di NaCl saggiate	0,00 - 1,25 - 2,50 - 5,00 - 10,00 - 20,00 g/L (Test 1 e 2) 0,00 - 1,50 - 3,00 - 6,00 - 12,00 - 24,00 g/L (Test 3)
N° repliche/concentraz.	20
Acqua di diluizione	Come da ISO 12890:1999
Temperatura esposizione	26±1°C
Fotoperiodo	12 ore luce: 12 ore buio
Endpoints osservati	<b>Mortalità</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coagulazione dell'embrione</li> <li>• Mancanza di formazione dei somiti</li> <li>• Non distacco della coda dal sacco vitellino</li> <li>• Mancanza del battito cardiaco (dalle 48 ore di osservazione)</li> </ul>
Criteri di accettabilità	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tasso fertilizzazione delle uova ≥70%</li> <li>• Temperatura: 26±1°C per tutto il test</li> <li>• Sopravvivenza embrioni nel controllo ≥90%</li> <li>• Tasso di schiusa nel controllo ≥ 80% a fine test</li> <li>• O<sub>2</sub> disciolto ≥ 80% a fine test nella concentrazione maggiore e nel controllo</li> </ul>

### **Risultati e discussione**

La riproduzione controllata del *Danio rerio* ha raggiunto una buona standardizzazione, con una produzione di uova in numero molto elevato (da circa 400 ad alcune migliaia).

Per quanto riguarda i saggi di tossicità, sono stati soddisfatti i criteri di accettabilità del test indicati nelle Tabelle 1 e 2.

Allo scopo di valutare la corrispondenza con i dati disponibili in letteratura (Lange et al., 1995) è stata calcolata la LC<sub>50</sub> a 48 ore.

Come si può osservare dalle Tabelle 3 e 4, tutti i risultati ottenuti a 48 ore, derivati dall'osservazione degli embrioni non ancora schiusi, sono in linea con il dato bibliografico [205 Mmol/L NaCl che corrisponde a 11,9 g/L NaCl].

Fra i vari endpoints letali ricercati, l'unico osservato dopo 48 ore di esposizione è stato la coagulazione dell'uovo (Metodo C.15 e FET).

Nei saggi eseguiti secondo il Metodo C.15 è stata calcolata anche la LC<sub>50</sub> a 8 giorni, derivata dalle osservazioni effettuate, oltre che sulle uova non schiuse, sugli stadi di embrione e di larva esposti direttamente alla sostanza in esame.

È interessante notare come il Metodo C.15 consideri anche l'osservazione di effetti subletali, come l'accrescimento, valutato dalla misura al microscopio della lunghezza totale delle larve a fine test; con tali dati sono state calcolate la NOEC e la LOEC.

Per quanto riguarda il FET è stata calcolata la LC<sub>50</sub> a 96 ore (Tabella 4). Tale valore è confrontabile con la LC<sub>50</sub> a 96 ore di un test di tossicità acuta [Metodo OECD 203] eseguito dal CdS ITTIOLAB su giovanili della specie *Danio rerio* [LC<sub>50</sub> 96 ore = 10,51 g/L NaCl; limiti fiduciali 95% = 8,75 - 12,62].

*Tabella 3. Risultati dei test eseguiti secondo il Metodo C.15*

NaCl (g/L)	TEST 1	TEST 2	TEST 3	MEDIA±D.ST.	Lange et al. (1995)
LC <sub>50</sub> 48h	12,56 (11,58 -	10,92 (9,71 -	12,32 (10,99 -	11,93±0,89	11,9

LC <sub>50</sub> 8gg	6,61 (5,95 - 7,34)	4,12 (3,63 - 4,67)	6,94 (6,28 - 7,66)	5,89±1,54	
NOEC 8gg (lunghezza)	1,25	1,25	0,75	1,08±0,29	
LOEC 8gg (lunghezza)	2,5	2,5	1,5	2,17±0,58	

Tabella 4. Risultati dei test eseguiti secondo il Metodo OECD 236 (FET)

NaCl (g/L)	TEST 1	TEST 2	TEST 3	MEDIA±D.ST.	Lange et al. (1995)
LC <sub>50</sub> 48h	10,82 (9,02 - 12,97)	12,05 (10,50 -	11,78 (10,15 -	11,55±0,65	11,9
LC <sub>50</sub> 96h	8,78 (7,42 - 10,40)	9,47 (7,72 - 11,61)	10,95 (9,22 - 13,02)	9,73±1,11	

### Conclusioni

Dai risultati ottenuti si evince come entrambi i Metodi che utilizzano stadi embrionali rappresentino un'alternativa al test di tossicità acuta con pesci (Metodo C.1), offrendo peraltro il vantaggio dell'utilizzo e dello smaltimento di quantitativi estremamente ridotti di soluzioni test.

Relativamente all'impiego del *Danio rerio*, il FET si presenta come l'alternativa migliore al test acuto, in quanto prevede l'esposizione del solo stadio embrionale, che è escluso dall'ambito di applicazione sia del Decreto Lgs n. 26 del 04/03/2014 sia della Decisione 2012/707/UE.

Allo scopo di offrire specie sia dulciacquicole che marine per la registrazione ai sensi del Regolamento REACH (Conti et al., 2015), il CdS ITTIOLAB di ARPA Ferrara ha deciso di portare entrambi i Metodi in certificazione BPL come obiettivo per il 2015.

### Bibliografia

Belanger S. E., Rawlings J. M., Carr G. J. (2013). Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 2013; 32(8):1768:83.

Conti D., Balzamo S., Paina A., Martone C., Raso E., Bellaria V., Cadoni F., Pati A., Savorelli F., Palazzi D., Croppo M., Trentini P. L. (2015). Il progetto REACH: "Inclusione del branzino (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) nei metodi OECD". Stato dell'arte. Atti della Giornata di studio "Emergenza ambiente: l'ecotossicologia come strumento di gestione. La ricerca, il controllo da parte delle Agenzie, il mondo dei privati", Livorno, 11-13 Novembre 2014, in stampa.

Decisione di esecuzione della Commissione del 14 novembre 2012 che stabilisce un modello comune per la trasmissione delle informazioni ai sensi della direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici [2012/707/UE]. [Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 320/33 del 17/11/2012].

Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. [GU n. 61 del 14/03/2014].

Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 276/33 del 20/10/2010.

EC 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.

Embry M. R., Belanger S. E., Braunbeck T. A., Galay-Burgos M., Halder M., Hinton D. E., Leonard M. A., Lillicrap A., Norberg-King T., Whale G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97 (2010) 79-87.

Knöbel M., Busser F. J. M., Rico-Rico A., Kramer N. I., Hermens J. L. M., Hafner C., Tanneberger K., Schirmer K. and Scholz S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the Zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46 (17), pp 9690-9700.

ISO 12890:1999 [E]. International Standard. Water quality – Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – Semi-static method.

Lammer E., Carr G. J., Wendler K., Rawlings J. M., Belanger S. E., Braunbeck T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149 (2009) 196-209.

Lange M., Gebauer W., Markl J. and Nagel R. 1995. Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere*, Vol. 30, No 11, pp 2087-2102.

Metodo C.1 "Tossicità acuta per i pesci". Commissione delle Comunità europee Regolamento 30 Maggio 2008, n. 440/2008/CE [GUUE 31 Maggio 2008 n. L 142]. Allegato – Parte C: Metodi per la determinazione dell'ecotossicità.

Metodo C.15 "Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larva con sacco vitellino". Commissione delle Comunità europee Regolamento 30 Maggio 2008, n. 440/2008/CE [GUUE 31 Maggio 2008 n. L 142]. Allegato – Parte C: Metodi per la determinazione dell'ecotossicità.

OECD GUIDELINE FOR TESTING CHEMICAL 203/1992 Fish Acute Toxicity Test.

OECD GUIDELINE FOR TESTING CHEMICAL 236/2013 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.

OECD GUIDELINE FOR TESTING CHEMICAL 212/1998 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages.

REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). GUUE 31 Maggio 2008 n. L 142.

# “FISH EMBRYO TOXICITY TEST (FET)”: POTENZIALE ALTERNATIVA AL TEST ACUTO SU PESCI

di I. Lacchetti <sup>a</sup>, C. Di Paolo <sup>b</sup>, P.M.B. Gucci <sup>c</sup>, M. Carere <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Istituto Superiore di Sanità (Italy) - [ines.lacchetti@iss.it](mailto:ines.lacchetti@iss.it)

<sup>b</sup> RWTH Aachen University (Germany) - [Carolina.DiPaolo@bio5.rwth-aachen.de](mailto:Carolina.DiPaolo@bio5.rwth-aachen.de)

<sup>c</sup> Istituto Superiore di Sanità (Italy) - [paola.gucci@iss.it](mailto:paola.gucci@iss.it)

<sup>d</sup> Istituto Superiore di Sanità (Italy) - [mario.carere@iss.it](mailto:mario.carere@iss.it)

---

**Abstract** - L'impiego del test acuto su pesci adulti, previsto attualmente sia dal Regolamento Europeo REACH che dalla normativa sulla classificazione dei rifiuti per la caratteristica H14, presenta indubbe difficoltà applicative ed etiche.

L'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'Università di *Aachen* (Germania) ha avviato studi di ricerca e applicazione sperimentale con lo scopo di verificare una alternativa a tale test tra quelli attualmente normati OECD. Pertanto è stato individuato il “Fish Embryo Toxicity (FET) Test”, che utilizza embrioni della specie *Danio rerio* e riconosciuto nella norma OECD n. 236, quale valida e fattibile alternativa al saggio su pesci adulti.

Keywords: metodi alternativi, rifiuti, Fish Embryo Toxicity Test, *zebrafish*, embrione.

## **Premessa**

L'impiego del test acuto sui pesci è previsto attualmente sia dal Regolamento Europeo REACH, dove viene inserito tra i biosaggi per la valutazione dell' ecotossicità acquatica di sostanze chimiche, sia dalla recente normativa sulla classificazione dei rifiuti per la caratteristica H14 (ecotossico per l'ambiente). Il test prevede l'utilizzo dell'organismo adulto, ciò in contrasto, tuttavia, con quanto indicato dalla Direttiva Europea 2010/63/EU sulla protezione degli animali usati a fini sperimentali, recepita in Italia con il D. Lgs n. 26 del 4 marzo 2014.

Nell'ambito di tali normative l'inserimento del test acuto sui pesci adulti non trova, inoltre, ampio consenso dalla maggior parte dei laboratori addetti ai controlli su territorio nazionale in considerazione delle indubbe difficoltà applicative. Tale test necessita infatti di ampi spazi, di apparecchiature adeguate e/o strutture idonee, nonché lo smaltimento di ingenti volumi di scarti prodotti, potenzialmente tossici, ad esempio per quanto concerne le analisi sulla caratterizzazione dei rifiuti.

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in collaborazione con l'Università di Aachen (Germania) ha avviato studi di ricerca e applicazione sperimentale con lo scopo di individuare una alternativa al test acuto sui pesci adulti, senza rinunciare, tuttavia, all'informazione essenziale e indispensabile che questi vertebrati forniscono nelle valutazioni sia di tipo ecotossicologico che sanitario, in relazione al ruolo chiave che essi occupano nella rete trofica. Contemporaneamente si è cercato un test che potesse fornire un supporto concreto alla ricerca di soluzioni pratiche per lo svolgimento di un saggio applicabile dalla maggior parte dei laboratori senza la necessità di particolari e costosi equipaggiamenti.

### ***Fish Embryo Toxicity (FET) Test***

La ricerca è stata, pertanto, indirizzata verso i test attualmente normati OECD condotti sui pesci (tabella 1), in particolare è stato selezionato il "Fish Embryo Toxicity (FET) Test" OECD n. 236, che risulta infatti essere l'unica norma ad utilizzare l'embrione nelle sue primissime fasi e che, per l'incapacità di alimentarsi indipendentemente, non è pertanto considerato tra le forme vitali protette. Il FET utilizza la specie ittica *Danio rerio*, nota come "zebrafish", vertebrato considerato "organismo modello" sia in campo biochimico che ecotossicologico; il suo genoma, inoltre, è stato completamente descritto e risulta effettivamente simile a quello umano.

*Tabella 1. Linee-guida OECD relative ai test ecotossicologici su pesci (ultime revisioni)*

<b>OECD N.</b>	<b>Linee guida</b>	<b>Procedure operative</b>
<b>203</b> 17/07/1992	Fish Acute Toxicity test	7 pesci/concentrazione 1g/L - in vasche 96 ore
<b>204</b> 04/04/1984	Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study	10 pesci /concentrazione 1g/L - in vasche 14 gg
<b>210</b> 26/07/2013	Fish early-life stage toxicity test	80 uova/concentrazione 0.5 - 5g/L - in vasche 30 gg
<b>212</b> 02/09/1998	Fish short term toxicity test on embryo and sac-fry stages	30 uova/concentrazione 0.5 - 5g/L - in vasche 8-50 gg
<b>215</b> 21/01/2000	Fish, juvenile growth test	10 pesci/concentrazione 5 - 10 pesci/L - in vasche 28 gg
<b>229</b> 02/10/2012	Fish short term reproduction assay	24 pesci/concentrazione 5g/L - in vasche 21 gg
<b>230</b> 07/09/2009	21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition	20 pesci/concentrazione 5g/L - in vasche 21 gg
<b>234</b> 28/07/2011	Fish Sexual Development Test	120 uova/concentrazione in vasche 60 gg
<b>236</b> 26/07/2013	<b>Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test</b>	<b>20 uova/concentrazione in piastre multipozzetto 96 ore</b>

In Europa il FET, viene utilizzato per testare farmaci, pesticidi e prodotti chimici; in Germania, già dal 2005, è stato reso obbligatorio per la sorveglianza delle acque reflue urbane ed industriali (DIN 38415-6).

Tale saggio è stato scelto e utilizzato anche nell'ambito del progetto Marie Curie "Eda Emerge", coordinato e condotto dai più importanti istituti europei tra cui la Commissione Europea (Joint Research Center) con lo scopo di approfondire la complessità della contaminazione ambientale da parte di inquinanti emergenti.

Il FET viene altresì richiamato nell'allegato del "*Technical report on aquatic effect-based monitoring tools*", documento elaborato su mandato della Commissione Europea dal gruppo di esperti europeo CMEP (Chemical Monitoring and Emerging Pollutants), coordinato anche dal Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'ISS con lo scopo di presentare lo stato dell'arte sugli strumenti "*effect-based*" di monitoraggio nell'ambito della strategia di implementazione comune della Direttiva Quadro Acque.

### ***Materiali e metodi***

Il FET è stato allestito in laboratorio con lo scopo di verificarne la sua fattibilità ed è stato pertanto condotto su campioni di rifiuti con caratteristiche chimiche differenti.

Il principio del FET si basa sull'esposizione di singole uova di *Danio rerio* poste in piastre da 24 pozzetti per valutare l'eventuale embriotossicità del campione.

Il test, che deve iniziare entro 90 minuti dalla fecondazione delle uova, viene condotto su cinque concentrazioni del campione. È previsto l'allestimento anche di un controllo positivo per ogni gruppo di uova utilizzate impiegando, come tossico di riferimento, la 3,4-dicloroanilina (3,4 DCA) alla concentrazione di 4 mg/L. Le piastre multipozzetto, contenenti 20 uova per ciascuna concentrazione, vengono incubate a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  con ciclo luce-buio per 96 ore.

Eventuali malformazioni dell'embrione vengono registrate attraverso l'osservazione ogni 24 ore di quattro distinti endpoint:

- a) **coagulazione dell'embrione** - può verificarsi anche entro poche ore dall'inizio dell'esposizione e indica un effetto tossico acuto generico;
- b) **la mancanza di formazione del somite** - il somite dovrebbe essere visibile dopo 12 ore dalla fecondazione; se assente, l'embrione non si svilupperà ulteriormente determinandone quindi la morte;
- c) **il mancato distacco della coda** - il distacco della coda dal tuorlo si osserva dopo 24 ore dalla fecondazione, indicando la normale crescita dell'embrione;
- d) **assenza di battito cardiaco** - il battito è facilmente rilevabile dopo 30 ore dalla fecondazione, la sua assenza indica la morte dell'embrione;

Al termine del periodo di esposizione, la tossicità acuta è determinata sulla base di un risultato positivo di una delle quattro osservazioni apicali registrate, ed espressa come LC50.

Per l'allevamento degli organismi riproduttori, sono stati scelti acquari da 60 litri facilmente reperibili in commercio, equipaggiati di 30 individui ciascuno in rapporto 3:1 maschi:femmine.

Poiché la deposizione delle uova avviene alle prime ore del giorno, gli acquari sono stati posti in una camera climatizzata al buio e collegati ad un temporizzatore per l'accensione delle lampade in modo da stimolare la deposizione delle uova all'orario più idoneo per l'operatore. Sono state provate diverse tipologie di "trappole" per la cattura delle uova con lo scopo di ottenerne un maggior numero, contestualmente a una minore difficoltà operativa. L'alimentazione seguita e le caratteristiche dell'acqua di mantenimento sono descritte in dettaglio nella norma OECD 236 e non presentano particolari complessità operative.

L'intero allestimento del test è avvenuto in un armadio termostato di piccole dimensioni a condizioni di temperatura e luce controllate. La lettura dei 4 endpoint è stata eseguita utilizzando un microscopio a inversione a ingrandimento 80x.

### ***Risultati***

Nella mattina stessa del test, mediante alloggiamento delle trappole sul fondo dell'acquario, è stata possibile la raccolta di circa 150 uova fecondate per ciascuna trappola, permettendo, in tal modo, l'allestimento di più test simultaneamente.

Dai dati ottenuti con il FET non è stato possibile il calcolo della LC50; i risultati conseguiti, riportati in tabella 2, sono stati espressi pertanto come percentuali cumulative di effetto, come previsto dalla norma.

Le percentuali ottenute sia per il controllo negativo che per il controllo positivo (3,4 DCA) rispettano le condizioni richieste per la validità del test.

*Tabella 2. Percentuali cumulative di effetto ottenute per i campioni di rifiuto analizzati*

Campioni	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4
Controllo negativo	0%	0%	0%	0%
W-1	5%	10%	20%	55%
W-2	0%	0%	0%	0%
W-3	0%	0%	20%	20%
W-4	0%	5%	5%	5%
W-5	0%	5%	5%	30%
3,4 DCA (4 mg/L)	0%	30%	70%	70%

### ***Discussione e conclusioni***

L'applicazione del FET non ha in definitiva mostrato particolari difficoltà operative, i risultati conseguiti sono stati inoltre incoraggianti poiché le percentuali di effetto ottenute confermano la tossicità attesa dovuta alle caratteristiche chimiche intrinseche dei campioni di rifiuto analizzati.

La scelta del FET da un punto di vista pratico-operativo presenta, rispetto a quello acuto su pesci, numerosi vantaggi che possono essere riassunti come di seguito:

- il tasso di sviluppo embrionale è più rapido se confrontato con l'adulto;
- gli embrioni presentano minori esigenze di crescita e non necessitano di alimentazione per l'intera durata del test;
- lo spazio richiesto per l'allestimento è minore;
- gli scarti prodotti contenuti (circa 200 mL *vs* 200 L);
- i costi e le risorse impegnate sono ridotte;
- il test è in accordo con la Direttiva 2010-63-EU.

È d'uopo considerare, tuttavia, alcune limitazioni ascrivibili al FET come nel caso di ridotta biodisponibilità per sostanze chimiche con  $PM \geq 3kDa$  che, ostacolate dal corion, ne potrebbe precludere o ridurre l'esposizione dopo la schiusa, e la capacità metabolica embrionale dei pesci che non sempre è simile a quella dell'adulto o degli stadi giovanili (es. l'alcool allilico).

Dal Report della Commissione Europea "EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity

Testing” si evince una forte correlazione ( $r=0,9$ ) tra il test su pesci adulti e il FET, dato che gli effetti ottenuti attraverso studi condotti in parallelo su circa 150 sostanze chimiche sono risultati ampiamente sovrapponibili.

Tale saggio, pertanto, può rappresentare una valida alternativa al test acuto su pesci adulti sia per la praticità del metodo sia poiché fornisce analoghe e sovrapponibili informazioni sulla valutazione della tossicità acquatica trasposta a quei livelli trofici più elevati rappresentati dai vertebrati.

### ***Bibliografia***

Belanger S.E., Rawlings J.M., Carr G.J. 2012. An update to the fish embryo toxicity-acute fish toxicity relationship and prospects for support of the use of the FET as an animal alternative. Document prepared for the 2012 OECD *ad hoc* Expert Meeting Group on the Fish Embryo Test. pp. 1- 156

Braunbeck T., Kais B., Lammer E., Otte J., Schneider K., Stengel D., Strecker R. 2014. The fish embryo test (FET): origin, applications and future. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-014-3814-7

Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.61 del 14-03-2014*

DIN 2001. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – Subanimal testing (group T) – Part 6: Toxicity to fish. Determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T 6). DIN 38415-6; German Standardization Organization.

Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 20-10-2010*. L. 276/33

EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing. JRC, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014

Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck T.H. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol Part C* 149(2): 196-209.

DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.11.006

RibèV, Nehrenheim E, Odlare M. 2014. Assessment of mobility and bioavailability of contaminants in MSW incineration ash with aquatic and terrestrial bioassays. *Waste Management*. 34: 1871-1876

Validation Report (Phase 1) for the zebrafish embryo toxicity test, Part I Series on Testing and Assessment N. 157 JTO3306145. ENV/JM/MONO [2011] 37

# NUOVO APPROCCIO METODOLOGICO PER MISURE RAPIDE IN ECOTOSSICOLOGIA

di P. Frisenda<sup>a</sup>, S. Losacco<sup>a</sup>, A. Milan<sup>a</sup>, M. Francese<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Shoreline Soc. coop. – shoreline@shoreline.it

---

**Abstract** - In questo lavoro vengono presentati alcuni risultati ottenuti in una fase sperimentale condotta da Shoreline nell'ambito del progetto WIS (Sistema integrato per il monitoraggio della qualità delle acque *in situ*) finalizzato a trovare sistemi di misura e precursori di biosensori per il monitoraggio della presenza di sostanze pericolose nelle acque. L'obiettivo era sviluppare possibili sistemi di lettura automatici, al fine di avere un protocollo analitico più rapido e meno dipendente dall'operatore. Tra le specie indagate, sono stati scelti due organismi procarioti: a) *Magnetospirillum gryphiswaldense*, batterio magnetotattico capace di mantenere l'orientamento in un campo magnetico indotto, caratteristica inibita in caso di esposizione ad una soluzione tossica; b) *Merismopedia* sp., cianofitea coloniale caratterizzata da una divisione cellulare bidirezionale, ortogonale e sincrona, che può essere alterata in condizioni stressogene. I risultati raggiunti sono stati: messa a punto dei metodi di mantenimento e di manipolazione delle popolazioni (trasferimento, inoculo, esposizione, etc.), analisi di endpoint, gestione dei test di verifica e calibrazione mediante esposizione a sostanze di riferimento, prima automatizzazione dei sistemi di lettura.

Keywords: endpoint sub-letale, batteri magnetotattici, cianofitea a crescita monostratificata sincrona.

## Introduzione

Il progetto WIS è nato per rispondere all'esigenza di superare il limite delle analisi in laboratorio ricercando nuovi metodi, nuove specie e nuovi endpoint al fine di semplificare i saggi ed abbassare nel contempo i tempi di analisi. Per valutare la qualità delle acque e l'effetto degli inquinanti sull'ecosistema, sono state completate e sviluppate le conoscenze incubate in azienda, assieme ad enti di varia estrazione e collaboratori. Per l'identificazione delle relazioni causa-effetto ci si è focalizzati prevalentemente su risposte di tipo qualitativo (soglia on-off), utilizzando acque reflue o simulando reflui potenzialmente pericolosi. Al fine di realizzare il primo stadio di prototipi per nuovi biosensori, già rilevabili da un sistema integrato automatico di lettura in continuo (Water Integrated Sensors) sono stati fissati i seguenti obiettivi:

- individuazione dei metodi di mantenimento e di manipolazione delle specie selezionate;
- individuazione degli endpoint e dei metodi di lettura;
- gestione di test di verifica e calibrazione mediante esposizione a sostanze di riferimento.

## Materiali e metodi

Tra le specie possibili di batteri è stato selezionato *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1) (Fig. 1: Tratto da: <http://telem.openu.ac.il/courses/c20237/magneto.htm>), spirillo Gram negativo, mobile, microaerofilo e magnetotattico isolato per la prima volta nel 1975 dal microbiologo R. P. Blakemore in acque stagnanti. Ha la capacità di assumere grandi quantità di ferro per sintetizzare magnetosomi (particelle magnetiche intracellulari composte da  $Fe_3O_4$ ), che permettono l'orientamento lungo le linee del campo magnetico terrestre (Blakemore, 1982; Yan *et al.*, 2012; Bennet *et al.*, 2014). La lettura dell'endpoint è stata eseguita dopo l'esposizione degli organismi ad un campo magnetico indotto mediante un alimentatore stabilizzato (Stab mod. AR30) provvisto di magneti (Fig. 2). L'osservazione della capacità di orientamento nel campo magnetico è stata eseguita dopo 24h dall'inoculo dei batteri (150  $\mu$ l) in cuvette in quarzo per spettrofotometria (cammino ottico di 1mm) nelle seguenti sostanze: Acetone (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M); Bicromato di Potassio (2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L); Solfato di Zinco (0.01 M, 0.1 M, 1 M); Acido Cloridrico (1M, 1.5 M e 3 M)



Figura 1



Figura 2

Tra le alghe unicellulari è stata scelta *Merismopedia* sp. (Fig. 3), una cianofitea coloniale (Chroococcales) caratterizzata da cellule ovoidali o sferiche (intervallo dimensionale 5,0-9,0 X 7,0-9,0  $\mu$ m) disposte in file ordinate a formare colonie rettangolari avvolte da una matrice mucillaginosa ialina. La divisione cellulare avviene in due direzioni perpendicolari rendendo particolare la forma finale della colonia costituita sempre da multipli di quattro cellule. Tale caratteristica si modifica in condizioni ambientali stressogene (Palinska & Krumbein, 1998).

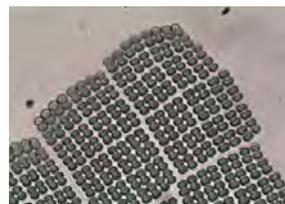


Figura 3

## Risultati

- Per eseguire le procedure di trasferimento ed inoculo degli organismi batterici è stata progettata e costruita *ad hoc* una camera per microaerofilia (Fig. 4).

Nelle diverse prove sperimentali, la risposta magnetotattica di *M. gryphiswaldense* è stata misurata valutando la presenza/assenza delle colonie batteriche nei punti in cui è stato applicato il magnete (Fig. 5, rettangoli rossi). Come si può notare nei controlli (CTRL) sono sempre presenti e ben visibili due gruppi distinti di colonie batteriche (migrate ed addensate ai due poli del magnete). Nei campioni trattati si può però osservare che: le concentrazioni di acetone utilizzate non hanno interferito con la capacità magnetotattica e la disposizione dei batteri è del



Figura 4

tutto simile a quella del controllo (Fig. 5A); il bicromato di potassio ha portato ad una graduale diminuzione della densità batterica all'aumentare della concentrazione (Fig. 5B), dimostrando una buona sensibilità di questa specie e dell'endpoint selezionato alla sostanza di riferimento; il solfato di zinco ha causato una forte inibizione della migrazione dei batteri fin dalla concentrazione inferiore mentre alla concentrazione più elevata si notava una torbidità diffusa, probabile segno di morte cellulare (Fig. 5C, rettangolo giallo); le concentrazioni di acido cloridrico utilizzate sono risultate, invece, troppo elevate determinando la morte di tutte le cellule inoculate (Fig. 5D).

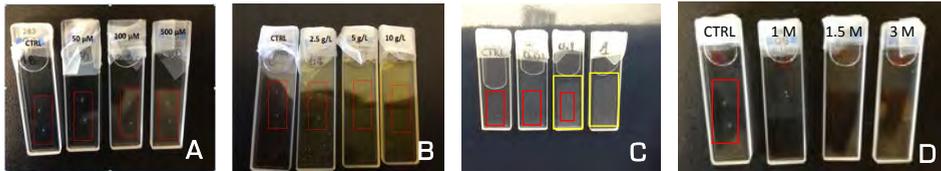


Figura 5 - Risposta magnetotattica di *M. griphiswaldense* ad un campo magnetico indotto prima (CTRL) e dopo l'esposizione a tossici di riferimento (A: acetone 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M - B: bicromato di potassio 2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L - C: Solfato di Zinco 0.01 M, 0.1 M, 1 M - D: Acido Cloridrico 1M, 1.5 M e 3 M). Foto: Annalisa Milan.

• Per l'alga unicellulare *Merismopedia* sp., al fine di favorire la crescita monostratificata e gli scambi gassosi o l'apporto di nutrienti essenziali, è stato necessario progettare e realizzare specifici supporti (Fig. 6). Questi favorivano anche la manipolazione nella fase di esposizione al tossico e nella successiva osservazione al microscopio. Nell'immagine sotto riportata si può osservare la colonia di *Merismopedia* sp. esposta ad un refluo sintetico al momento dell'inoculo (Fig. 7a) e dopo 72h di esposizione (Fig. 7b). La disposizione della colonia ed il numero di cellule presenti sono rimaste invariate indicando un'inibizione della crescita. Diversamente, nella colonia di controllo in figura 7c (al momento dell'inoculo) e 7d (dopo 72h) si osserva una normale crescita di popolazione caratterizzata dalla completa divisione cellulare sincrona e bidimensionale (sono evidenziate le duplicazioni cellulari per la prima fila di cellule della colonia indicate dai numeri 1-8).



Figura 6

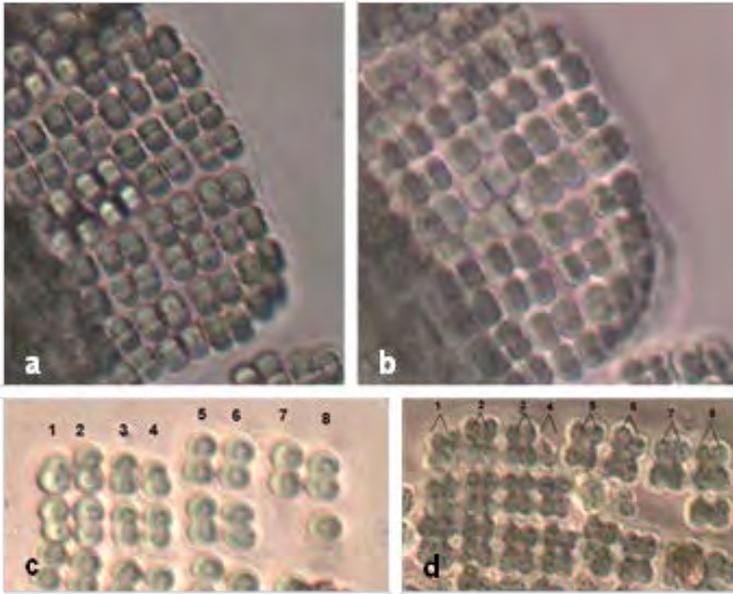


Figura 7 - *Merismopedia* sp.: a) e b) colonie esposte a refluo sintetico a 0h e 72h, rispettivamente; c) e d) colonie di controllo a 0h e a 72h dall'inoculo.

### ***Prospettive future***

Sulla base dei risultati ottenuti Shoreline è interessata ad attuare una seconda fase di ricerca che persegue l'obiettivo di utilizzare queste due specie per saggi biologici sperimentali da validare con sistemi di misura di endpoint sub-letali mediante sistemi di rilevazione autonomi, basati su misure dirette o indirette degli effetti, supportati anche da tecniche di polimerizzazione e nano-ingegnerizzazione. Si intende mettere a punto: a) le condizioni necessarie a garantire l'applicabilità della misura a matrici molto complesse; b) le condizioni per garantire la massima vitalità delle specie e quindi la massima durata nel tempo del sistema; c) la riproducibilità della risposta e l'affidabilità nel tempo delle valutazioni fornite dal sistema.

### ***Bibliografia***

Bennet M., McCarthy A., Fix D., Edwards M.R., Repp F., Vach P., Dunlop J.W.C., Sitti M., Buller G.S., Klumpp S., Faivre D. 2014. Influence of magnetic Fields on Magneto-aerotaxis. PLoS ONE 9(7) e101150.  
 Blakemore R. P. 1982. Magnetotactic bacteria. Annual Reviews Microbiol., 36: 217 - 238.  
 Palinska K.A., Krumbein W.E. 1998. Patterns of growth in coccoid, aggregate forming cyanobacteria. Ann. Bot. Fennici, 35: 219-227.  
 Yan L., Zhang S., Chen P., Liu H., Yin H., Li H. 2012. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. Microbiological Research, 167: 507-519.

# VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA DI UN SUOLO CONTAMINATO DA IDROCARBURI SOTTOPOSTO A BONIFICA

di I. Lacchetti<sup>A</sup>, P.M.B. Gucci<sup>B</sup>, A.M. Coccia<sup>C</sup>, R. Paradiso<sup>D</sup>, E. Beccaloni<sup>E</sup>

<sup>A</sup>Istituto Superiore di Sanità - ines.lacchetti@iss.it

<sup>B</sup>Istituto Superiore di Sanità - paola.gucci@iss.it

<sup>C</sup>Istituto Superiore di Sanità - annamaria.coccia@iss.it

<sup>D</sup>Istituto Superiore di Sanità - rosa.paradiso@iss.it

<sup>E</sup>Istituto Superiore di Sanità - eleonora.beccaloni@iss.it

---

**Abstract** - Nel presente lavoro si riportano i dati di uno studio integrato condotto su suolo contaminato da idrocarburi pesanti e da idrocarburi policiclici aromatici sottoposto a sperimentazione di *bioremediation* di tipo *landfarming*.

Al fine di valutare l'efficienza/efficacia della tecnica impiegata su tali tipologie di inquinanti, nonché di individuare una possibile e finale destinazione d'uso del suddetto suolo in base ai dettami normativi, è stata effettuata una caratterizzazione a livello fisico-chimico, microbiologico ed ecotossicologico prima, durante e dopo il trattamento di risanamento biologico. Su campioni rappresentativi del suolo, pertanto, oltre alla stima della flora microbica attiva e del conseguente abbattimento della concentrazione degli inquinanti presenti, è stato valutato il grado di tossicità acuta e cronica mediante l'impiego del biosaggio con l'ostracode *Heterocypris incongruens* e del test di fitogerminazione.

Parole chiave: *bioremediation*, ecotossicità, IPA, ostracodi, suolo

## **Introduzione**

L'inquinamento del suolo da idrocarburi pesanti e da idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituisce un aspetto preoccupante per la salute umana date le annesse proprietà tossiche, mutagene e cancerogene.

Il presente studio è stato effettuato su un sito industriale petrolchimico dismesso di circa 700.000 m<sup>2</sup> contaminato da composti petroliferi tra i quali idrocarburi C>12 e IPA. Su una porzione del sito è stata condotta una sperimentazione di risanamento biologico espletato mediante la tecnica di *bioremediation-bioaugmentation* di tipo *landfarming*. Tale procedura permette la degradazione naturale degli inquinanti presenti nel suolo attraverso inoculi ciclici di una specifica miscela nutritiva ed enzimatico-batterica.

Lo studio è stato condotto a livello integrato attraverso la caratterizzazione fisico-chimica, microbiologica ed ecotossicologica del suolo, allestita durante tutto il trattamento di bonifica ed espletata su campioni rappresentativi di terreno prelevati in fasi diverse del trattamento. Si è voluto valutare non solo la qualità e la salubrità del suolo a bonifica conclusa in termini di abbattimento della concentrazione degli inquinanti presenti, ma anche attraverso il supporto dell'indagine ecotossicologica, la possibile e finale destinazione d'uso in base a quanto disposto dal Decreto Legislativo 152/06.

## ***Materiali e metodi***

La sperimentazione, condotta in campo, ha interessato una porzione di 4000 m<sup>2</sup> del sito industriale dismesso, trattando complessivamente 100.000 tonnellate di suolo contaminato per un periodo di 27 mesi nel quale sono stati allestiti 15 cicli di trattamento biologico. Ogni ciclo ha previsto il trattamento su circa 7000 tonnellate di terreno. Il suolo contaminato è stato stratificato e quindi addizionato con enzimi e batteri altamente selezionati e con nutrienti sinergizzanti prontamente biodisponibili. Ad ogni inoculo della miscela enzimatico batterica sono stati eseguiti rivoltamenti periodici per favorire e garantire l'ossigenazione del terreno, l'adeguata miscelazione e l'avvio dei processi metabolici di degradazione.

### ***Campionamento del suolo e preparazione del campione***

Per determinare il grado di contaminazione del suolo, la sua eventuale tossicità e la flora microbica autoctona presente, campioni di terreno sono stati prelevati in differenti punti del sito dettagliatamente georeferenziati. In ogni punto è stato eseguito uno scavo fino alla profondità di 3 metri mediante benna meccanica e sulla verticale di scavo, oltre al prelievo di terreno dai diversi strati, sono stati misurati pH, temperatura e umidità tramite sonda multiparametrica a infissione. I campioni sono stati quindi alloggiati in barattoli di vetro sterili e, in laboratorio, è stato allestito il campione composito, rimisurato il pH e determinato il peso secco per poi procedere con le analisi chimiche, microbiologiche ed ecotossicologiche. Durante e a conclusione della sperimentazione di *bioremediation* sono state prelevate, e trasportate refrigerate in laboratorio, numerose aliquote di terreno processate anch'esse come sopra descritto.

### ***Analisi chimiche***

Gli idrocarburi C>12 e gli IPA sono stati determinati secondo i metodi ISO-DIS 16703 ed EPA 3510C e 8270D, rispettivamente.

### ***Analisi microbiologiche***

La flora batterica presente nel suolo è stata stimata indagando le componenti aerobiche vitali contabili psicrofile e mesofile, i Gram negativi, i degradatori primari come *Pseudomonas* spp. e *P. aeruginosa*, Muffe, Lieviti e Attinomiceti.

Il campione composito, sospeso 1:10 in soluzione fisiologica tamponata sterile, previa omogeneizzazione meccanica in Stomacher circulator 500, è stato sottoposto a diluizioni seriali, aliquote note delle quali sono state seminate in triplo su piastre di Petri contenenti i terreni culturali appropriati per ogni parametro in indagine e quindi incubate alle temperature e tempi idonei allo sviluppo delle colonie.

### ***Analisi ecotossicologiche***

Le analisi ecotossicologiche sono state effettuate direttamente sul campione di suolo mediante l'utilizzo dei kit-test con Ostracodi (Ostracodtoxkit F®) e Fitotossicità (Phytotoxkit F®) disponibili in commercio.

Ostracodi neonati di circa 200 µm della specie *Heterocypris incongruens* sono stati trasferiti in triplo in piastre multipozzetto e incubati al buio a 25±2°C per 6 giorni. La tossicità acuta, espressa come percentuale di mortalità rispetto alla matrice di riferimento, è stata ottenuta contando gli organismi non vitali. Quando tale percentuale è stata rilevata con incidenze inferiori al 30% si è stimato l'effetto subletale misurando, previo fissaggio con Lugol, la lunghezza degli organismi vitali; il dato ottenuto è stato espresso come percentuale di inibizione di crescita.

Per il saggio di fitotossicità sono stati utilizzati i semi di tre specie vegetali a crescita rapida: *Sinapis alba* e *Lepidium sativum*, dicotiledoni e *Sorghum saccharatum*,

monocotiledone. Il saggio è stato condotto in triplo utilizzando per ciascuna specie 10 semi incubati a 25±2°C a 3000-4000 lux per 72 ore. La tossicità acuta, espressa come percentuale di germinazione, è stata stimata mediante conteggio dei semi germinati rispetto alla matrice di riferimento. La tossicità cronica, espressa come percentuale di inibizione dell'allungamento radicale, è stata determinata misurando la lunghezza dell'apparato radicale.

### Risultati

Nelle tabelle 1 e 2 vengono rispettivamente riportate le concentrazioni degli idrocarburi C>12 e IPA e le concentrazioni microbiche vitali rilevate a monte e a valle del trattamento di *landfarming*. Nelle tabelle 3 e 4 si riportano i risultati ottenuti dalle analisi ecotossicologiche.

Tabella 1. Concentrazioni di Idrocarburi pesanti e idrocarburi policiclici aromatici

Ciclo	Concentrazione idrocarburi (mg/Kg <sub>w</sub> )			
	C>12		IPA	
	pre-bonifica	post-bonifica	pre-bonifica	post_bonifica
I	1373	250	13,65	1,65
II	1250	225	12	1,57
III	2225	275	10	1,80
IV	1162	237	11,35	1,95
V	1250	287	10,50	1,79
VI	1912	250	13,35	1,60
VII	1975	225	11,10	1,42
VIII	1775	262	10,90	1,65
IX	1562	275	10,65	1,82
X	1762	237	11,50	1,28
XI	1650	212	10,93	1,56
XII	2000	225	10,50	1,49
XIII	1550	262	12	1,75
XIV	1912	257	10,79	1,59
XV	1575	242	10,51	1,90

Tabella 2. Concentrazione dei microrganismi vitali contabili

Parametri	Concentrazione microbica vitale (UFC/g <sub>w</sub> )	
	pre-bonifica	post-bonifica
Batteri psicrofili totali	4,2x10 <sup>6</sup>	2,4x10 <sup>6</sup>
Batteri mesofili totali	6,8x10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>
Batteri gram negativi totali	8,1x10 <sup>4</sup>	7,8x10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas</i> spp	4,6x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,6x10 <sup>5</sup>	3,1x10 <sup>5</sup>
Muffe	1,6x10 <sup>5</sup>	5,3x10 <sup>5</sup>
Lieviti	1,2x10 <sup>6</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>
Attinomiceti	1,2x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>

Tabella 3. Fitotossicità rilevata con le specie vegetali

Fasi del	inibizione	Specie vegetali
----------	------------	-----------------

trattamento	(%)	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorgum saccharatum</i>
pre-bonifica	germinazione	0	23,0	11,0
	crescita	32,6	53,9	40,6
intermedia	germinazione	0	8,3	0
	crescita	18,1	29,5	31,6
post-bonifica	germinazione	0	0	0
	crescita	3,8	8,6	15,8

Tabella 4. Tossicità rilevata con *Heterocypris incongruens*

Fasi del trattamento	Effetto tossico	
	acuto	subletale
	% mortalità	% inibizione crescita
pre-bonifica	100,0	-
intermedia	43,12	-
post-bonifica	6,67	15,74

### Discussione

La tecnica di risanamento applicata ha prodotto un abbattimento dell' 80-90% della concentrazione sia degli idrocarburi C>12 che di IPA raggiungendo valori inferiori ai limiti previsti dal D.Lgs. 152/06, consentendo un riutilizzo del suolo bonificato a fini commerciali/industriali e, solo per l'abbattimento degli IPA, anche a fini residenziali. A livello microbiologico le concentrazioni rilevate hanno evidenziato un suolo biologicamente dinamico.

Il test con l'ostracode *Heterocypris incongruens* ha rilevato condizioni di tossicità acuta prima del trattamento con mortalità degli organismi pari al 100% e ne ha evidenziato il notevole decremento a fine bonifica.

Il test di fito germinazione non ha evidenziato tossicità acuta rilevante, sia prima che dopo il processo di *landfarming*, tuttavia i valori ottenuti per la tossicità cronica mostrano una sensibile diminuzione a fine trattamento.

### Conclusioni

Il saggio con *Heterocypris incongruens* si è dimostrato particolarmente efficace nella valutazione della tossicità dei contaminanti presenti dato che essi vengono a diretto contatto con l'apparato digerente del microcrostaceo-test e la stima della tossicità non è in tal modo influenzata dal fenomeno di interazione chimico-fisica degli inquinanti con la matrice come avviene, invece, per il test di fitotossicità. I dati emersi consentono di concludere complessivamente che è possibile stimare il grado di tossicità acuta direttamente su matrici solide senza utilizzare estratti acquosi che, in quanto tali, rappresentano una approssimazione del problema reale.

### Bibliografia

Bacosa H., Suto K., Inoue Ch. 2010. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium, Int Biodet Biodegr 64: 702-710.

Chial B., Persoone G. 2003. Cyst-based toxicity tests XV- Application of ostracod solid-phase microbiotest for toxicity monitoring of contaminated soils. Environ Toxicol 18: 347-352.

Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 "Norme in materia ambientale" G. U. n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.

EPA 3510C: 1996. Separatory funnel liquid-liquid extraction.

EPA 8270D: 2007. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass Spectrometry (GC/MS).

Hamdi H., Benzarti S., Manusadzianas L., Aoyama I., Jedidi N. 2007. Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. *Chemosphere* 70(1): 135-143.

Haritash A.K., Kavshik C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a Review. *J Hazard Mater* 169(1-3): 1-15.

ISO-DIS 16703: 2004. Soil quality - Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography.

Manzo S., De Nicola F., De Luca Picione F., Maisto G., Alfani A. 2008. Assessment of the effects of soil PHA accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere* 71: 1937-1944.

Mastrangelo G., Fadda E., Marzia V. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect* 104: 1166-1170. Ostracodtoxkit F<sup>®</sup> e Phytotoxkit F<sup>®</sup> : MicroBioTests Inc. Kleimoer 15 - 9030 Mariakerke (Gent) Belgium. [www.microbiotests.be](http://www.microbiotests.be).

Plaza G., Nalecz-Javecki G., Ulfig K., Brignon R.L. 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59: 289-296.

Rogers S.W., Ong S.K., Kjartanson B.K., Golchin J., Stenback G.A. 2002. Natural attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites: review. *Pract Period Hazard Toxic Radioact Waste Manage* 6: 141-155.

Steliga T., 2011. The use of biotests in estimation of weathered drilling waste bioremediation. *Arch Environ Prot* 37(2): 61-79.

# ASSESSMENT OF THE ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS RELATED TO THE USE OF NATURAL ORGANIC COAGULANTS IN THE PRIMARY TREATMENT OF WASTEWATERS AT URBAN AND INDUSTRIAL LEVEL.

by G. Sabia<sup>a</sup>, A. Giuliano<sup>a</sup>, R. Farina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ENEA, Laboratory of Protection and Management of Water Resources, via M.M. Sole, 4, 40129 Bologna, Italy - gianpaolo.sabia@enea.it

---

**Abstract** - Natural coagulants have been receiving much attention in wastewater treatments and sludge conditioning for their eco-friendly and safety characteristics. In this field, the LIFE Adnatur project is aimed at demonstrating the efficacy of new natural based coagulants based on tannin extracted from the Black Acacia bark. Among the products tested in the project, Ecotan Bio 90D was chosen for the evaluation of the potential toxicity effects. Results were compared with a common inorganic metal based coagulant [i.e. FeCl<sub>3</sub>]. The natural coagulant toxicity in aquatic systems was determined by measuring the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri* while the potential effects on the biological compartments of a conventional waste water treatment plant were evaluated by estimating the activated sludge activity inhibition by means batch respirometric tests. Moreover, in order to define the coagulant biodegradability, in both aerobic and anaerobic conditions, respirometric techniques and batch test for the assessment of the potential methane production (BMP test) were coupled. BMP tests were carried out on the sludge settled during Jar tests which permitted, by simulating the coagulation/flocculation process, to define the optimal natural coagulant dosage for sludge recovery maximization. The natural coagulant showed to not imply any toxic effects for aquatic life and activated sludge biomass. Moreover the product showed to have a good degree of biodegradability both in aerobic and anaerobic conditions.

Keywords: natural coagulant, ecotoxicity, biodegradability, biomethane potential production, respirometry.

## Introduction

The main applications of polyelectrolytes in wastewater treatment plants (WWTP) are in coagulation-flocculation processes, in dewatering and thickening the settled sludge [Bolto B., Gregory J. 2007]. In recent years there has been an increasing interest in the development of natural coagulants produced or extracted from microorganisms, animal or plant tissues. In comparison with synthetic or inorganic coagulants, natural based products has shown to be safer for human health and environmental ecosystems. Among the results highlighted by several studies [Vijayaraghavan G. *et al.*, 2011; Bolto B., Gregory J. 2007], the use of natural organic coagulants implies advantages in energy and resources saving, reduction of coagulant dosage, elimination of other chemicals such as neutralizing agents and substitution of hazard chemicals. Moreover, advantages are identifiable for the improvement of biological processes and sludge conditioning.

In this context, LIFE Adnatur project (LIFE12/ENV/ES/00265) is focused on the validation, assessment and demonstration of the efficacy of a new developed product line based on natural coagulants for the urban and industrial wastewater primary

treatment. The developed technology is based on tannin extracted from the Black Acacia bark [*Acacia mearnsii*] and further chemically modified to improve the coagulation efficiency. Preliminary analysis on the effectiveness of coagulation and flocculation process using the natural coagulants in urban, ceramic and textile wastewater treatments have been highlighted by executing several lab tests [[www.adnatur.com](http://www.adnatur.com)].

The actual study was directed to assess the biological implications connected to the use of a cationic, low molecular weight coagulant named Ecotan Bio 90D, in primary WWTP and, more in general, the potential environmental impacts and ecotoxicological risks associated with its use. The coagulant aquatic toxicity, the potential effects on the activated sludge biomass as well as its biodegradability, in aerobic and anaerobic conditions, were evaluated combining biological essays and batch test techniques.

### ***Materials e methods***

The experimental plan defined in this paper was based on the comparison of the Ecotan Bio 90D with ferric chloride as one common metal based coagulant in WWTP. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay was employed to evaluate the two coagulant aquatic toxicity. The test was carried out by using the Lumistox™ 300 system according to the ISO 11348-3 (1998) standard for the chronic toxicity evaluation. The procedure was slightly modified by correcting the pH up to 5.5 (for both the sample and the control) avoiding the precipitation of coagulant solutions. The bacterial bioluminescence was read at 30 minutes.

The activated sludge inhibition was evaluated by means respirometric techniques based on the rate of O<sub>2</sub> consumption measured as OUR (Oxygen Uptake Rate) (OECD 1993a; Polo *et al.*, 2011). The sludge biomass for the batch tests was taken from the aerated basin at a municipal WWTP located in Bologna and the equipment employed was an automatic respirometer (MARTINA™, SPES). The respiration rate of activated sludge samples (500 ml) was evaluated firstly by spiking an easily biodegradable substrate (i.e. Sodium acetate trihydrate, NaOAc) followed by the addition of the same amount of NaOAc together with increasing coagulant concentrations. Data achieved from *Vibrio fischeri* essay and from the batch respirometric experiments were computed for the inhibition percentage calculation (I<sup>H</sup>%) and, further, the log concentration–log response data were fitted with a gamma-function for EC50 estimation. The aerobic Ecotan Bio 90D biodegradability was evaluated by means batch respirometric experiments, following the procedures reported by MARTINA™, which permitted to quantify the coagulant biodegradable share (BCOD) expressed as a percentage of the chemical oxygen demand (COD) content.

The batch tests in anaerobic conditions were based on the estimation of the biomethane production rate achievable from primary sludge settled performing Jar tests where the coagulants were applied for urban raw sewage samples treatments. The tested natural coagulant dosages, from 0 to 300 ppm, indicated 300 ppm as the most effective for primary sludge recovery. Consequently, the same dosage was applied conducting Jar tests with ferric chloride. The assessment of the settled sludge anaerobic biodegradability was carried out in batch test (BMP test, Angelidaki *et al.*, 2009) by using a commercial laboratory instrument (AMPTS, Bioprocess Control, Sweden). The gas-tight glass bottles were inoculated with the liquid fraction of digested sludge (TS and VS content resulted in 52.8 and 35.9 g/kg<sub>wet</sub> respectively) drawn from a mesophilic farm-scale anaerobic digestion plants. Each closed vessels were maintained in mesophilic conditions for at least 30 days applying substrate/inoculum ratio around 3 gVS/gVS. The daily production of biogas

produced was automatically recorded and the results were expressed in terms of Specific Methane Production (SMP:  $\text{Nm}^3\text{CH}_4/\text{tVSS}$ ).

## Results

The comparison between the use of Ecotan Bio 90D and  $\text{FeCl}_3$  as primary coagulants achieved from the several tests carried out is reported in Tab.1.

Table 1. Results of ecotoxicological tests and coagulant biodegradability evaluations.

	Ecotan Bio 90D	$\text{FeCl}_3$
Bioluminescence essay	EC50 (mg/l) [95% Conf. Interval]	
	5326.1 [2870.8-9881.3]	339.9 [263.9-435.5]
Sludge inhibition activity	EC50 (mg/l) [95% Conf. Interval]	
	ND	313.4 [136.5-719.7]
Biodegradability	10% BCOD (COD 180 g/l)	
TS (VS% on TS)	6090 g/l (88.2%)	7690 g/l (55.9 %)
SMP	164.7 $\text{Nm}^3/\text{tVSS}$	113.6 $\text{Nm}^3/\text{tVSS}$
$K_d$	0.28 $\text{d}^{-1}$	0.16 $\text{d}^{-1}$

*Vibrio fischeri* essay showed for Ecotan Bio 90D a very high EC50 value which, however, came out of an extrapolation since the max bioluminescence inhibition achieved was around 50%. No toxic effects for Ecotan Bio 90D on activated sludge samples were experimented during the batch respirometric essays. Both the two ecotoxicity tests carried out on  $\text{FeCl}_3$  reported an EC50 value around 300 ppm. Fig. 1 shows two respirograms obtained for the same dosage of Ecotan Bio 90D and  $\text{FeCl}_3$ . Precisely, the former OUR peak is related to NaOAc addition (20 mg/l) whereas the latter is due to NaOAc and coagulant dosage spike (20 mg/l of NaOAc and 120 mg/l of coagulants). Clearly, whereas the natural coagulant implied an increase in the respiration rate, the same  $\text{FeCl}_3$  concentration caused a sludge inhibition effect. As confirmed from Ecotan Bio 90D biodegradability evaluation, the biodegradable organic fraction (BCOD) is about 10% of the total COD amount. This could easily explain the increase of activated sludge activity.

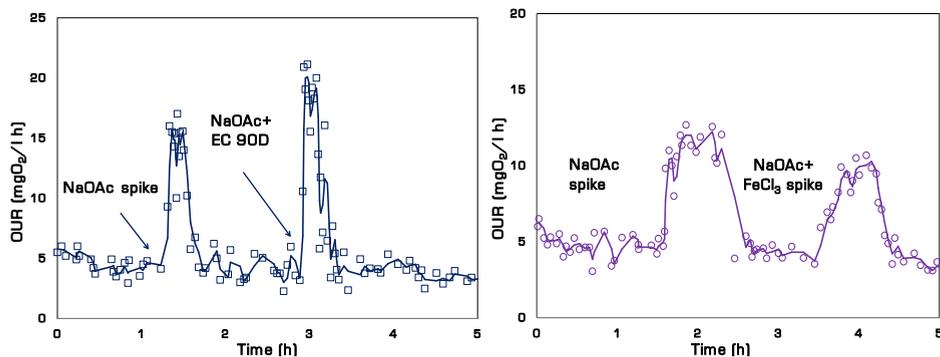


Figure 1. OUR profile of a) Ecotan Bio 90D and b)  $\text{FeCl}_3$  for the activated sludge activity inhibition estimation.

The sludge settled during the Jar tests were characterized by determining the total suspended solids (TS) as well as the volatile content (VS). The primary sludge produced by the use of Ecotan Bio 90D showed a TS content equal to 6090 mg/L with a high volatile fraction (88.2% on TS), whereas the sludge settled with FeCl<sub>3</sub> reported a concentration of 7790 mg/l with a lower volatile fraction (55.9% on TS). This preliminary result suggested a great difference in terms of potential energy recovery between the two substrates in anaerobic conditions. In fact, at the end of BMP trials, the sludge linked to the use of Ecotan Bio 90D showed a specific methane production (164.7 Nm<sup>3</sup>/tVSS) 45% greater than the sludge produced by FeCl<sub>3</sub> (113.6 Nm<sup>3</sup>/tVSS).

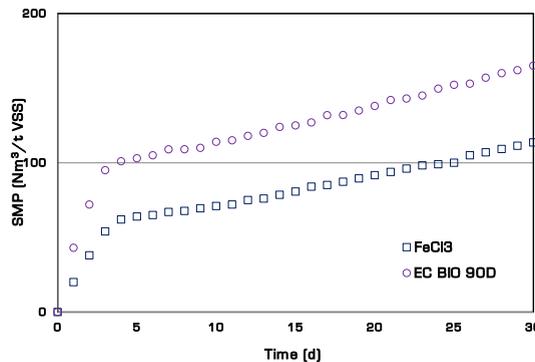


Figure 2. Potential Biomethane Production achieved from the settled sludge during the experimental trials.

Anaerobic degradation of complex organic materials has been described as a sequential process involving several steps such as hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis (Batstone D.J., *et al.*, 2002). Although, the hydrolysis of complex organic material has been considered the rate-limiting step of the anaerobic digestion process, Figure 2 shows that for both the samples, the most of the energy recovered from the substrates was reached within the first 5 days, when the methane production resulted more than 60% of the ultimate methane achieved. This aspect could be explained by the high inoculum to substrate ratio adopted in the experimental trials (Fernandez B. *et al.*, 2001). The greater anaerobic biodegradability of the settled sludge was confirmed by the value of the first order hydrolysis constant ( $K_d$ ) as reported in Table 1.  $K_d$  values were calculated on the first part of the experimental curve according to Angelidaki *et al.* 2009. Indeed, the primary sludge produced by Ecotan Bio 90D showed a reaction rate of the hydrolysis step about 75% greater than FeCl<sub>3</sub>.

## Discussion

The *Vibrio fischeri* bioluminescence essay revealed for the natural coagulant a very elevated EC50 value which results to be too high respect to the typical coagulant dosages in primary WWTP ( i.e. 50-200 ppm for FeCl<sub>3</sub>). Moreover, the EC50 derived from a data extrapolation since the maximum inhibition percentage achieved was equal to 48%. At the same time, the tests carried out on activated sludge samples for the evaluation of respiration rate inhibition due to Ecotan Bio 90D applications reported no effective toxic effects. Moreover, by adding the natural coagulant (at

lower dosage] the sludge biomass activity appeared even stimulated. Batch respirometric tests highlighted as about 10% of Ecotan Bio 90D COD is readily biodegradable and this could explain the increase of the activated sludge activity. On the contrary the EC50 values calculated for FeCl<sub>3</sub> resulted to be close to the common ferric chloride dosage range applied in the primary treatment of sewage water. Comparable results were achieved from ecotoxicological tests. In fact, both the *Vibrio fischeri* bioluminescence essay and the activated sludge inhibition activity estimation reported EC50 values around 300 ppm. However it should be considered that downstream of the process of clariflocculation, the coagulant concentrations in the supernatant, hereafter directed to the oxidation basin, result to be lower than the applied dosages. Moreover, the efficiency and the reactivity of a specific coagulant depends on several parameters such as the pH and the presence of carbonates in the wastewater to be treated. On the basis of these considerations, ecotoxicological effects on the active biomass of a WWTP are excludable also for ferric chloride. The results of BMP trials show clearly that Ecotan Bio 90D produced a primary sludge with a higher anaerobic biodegradability than FeCl<sub>3</sub>. Likely, since the different origin and chemical characteristics of the two coagulants, the mechanism they promote during coagulation/flocculation processes are different. As showed, the sludge settled by the use of Ecotan Bio 90D reported a greater SV to TS percentage ratio in comparison with the sludge achieved by applying the inorganic coagulant.

### ***Conclusions***

Bioluminescence essay and sludge inhibition activity tests showed as the ECOTAN BIO 90D coagulant doesn't imply any toxic effects for bacterial community. The estimated EC50 values resulted to be too far from the typical coagulant dosages applied in primary wastewater treatments. The good level of biodegradability as well as the increase in methane production rate during the anaerobic tests are considered plausible results since the ECOTAN Bio 90D organic nature. As a matter of fact the natural coagulant has shown no toxic effects for both the aquatic life and the sludge biomass activity. Moreover, the product resulted to have a good level of biodegradability in both aerobic and anaerobic conditions. On the other hand, lab tests conducted in the Adnatur project partner labs have shown the efficiency of natural coagulants in coagulation/flocculation processes. The highlighted advantages connected to the use of natural products as primary coagulants in WWTP are to be demonstrated at industrial level by means two wastewater treatment prototype plants to be located in different real end-users facilities from textile, ceramic sector firstly and, then, at urban wastewater level.

### ***Acknowledgment***

The research work was performed under the European contract LIFE12/ENV/ES/00265 in the project ADNATUR - Demonstration of natural coagulant use advantages in physical & chemical treatments in industry an urban waste water.

### ***Bibliography***

Angelidaki I., Alves M., Bolzonella D., Borzacconi L., Campos J.L., Guwy A.J., Kalyuzhnyi S., Jenicek P., van Lier J.B. 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid

organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.*, 59 [5]: 927-934.

Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S. V., Pavlostathis S.G., Rozzi A., Sanders W.T.M., Siegrist H. and Vavilin V.A. 2002. Anaerobic Digestion Model No.1. (ADM1). *Wat.Sci.Technol.*, 45(10), 65-73.

Bolto B., Gregory J. 2007 Review: Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Research* 41: 2301-2324.

Fernandez B., Porrier P., Chamy R. 2001. Effect of inoculum-substrate ratio on the start-up of solid waste anaerobic digesters *Water Sci. Technol.*, 44 [4] [2001], pp. 103–108.

ISO 11348-3:2007. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria.

OECD (1993a) 209 Activated sludge, respiration inhibition test, OECD guidelines for testing of chemicals. Organisation for Economic Co-operation and development, Paris.

Polo A.M., Tobajas M., Sanchis S., Mohedano A. F., Rodriguez J. J. 2011. Comparison of experimental methods for determination of toxicity and biodegradability of xenobiotic compounds. *Biodegradation* 22:7514-761.

Vijayaraghavan G., Sivakumar T., Vimal Kumar A. 2011. Application of plant based coagulants for waste water treatment. *IJAERS Vol. I Issue I*: 88-92.

# L'ESPERIENZA DI ARPA UMBRIA: 10 ANNI DI CONTROLLI ECOTOSSICOLOGICI DELLE ACQUE DI SCARICO.

di E.Ciccarelli<sup>1</sup>, L. Galli<sup>2</sup>, G. Taramella<sup>3</sup>

<sup>1</sup>A.R.P.A. Umbria (Regional Agency for Environmental Protection in Umbria), Via Pievaiola S. Sisto 06132 - Perugia e-mail: e.ciccarelli@arpa.umbria.it

---

**Abstract** - Le indagini ecotossicologiche, rappresentano un valido strumento di controllo delle acque di scarico, in quanto permettono di valutare gli effetti tossici degli inquinanti, in esse eventualmente presenti, sulle biocenosi dei corpi idrici recettori e del suolo. Scopo del lavoro è quello di presentare i dati raccolti in 10 anni di controlli eseguiti dall'Agenzia Regionale per l'Ambiente della Regione Umbria (ARPA Umbria) sulle acque reflue con *Daphnia magna* e di individuare la tipologia di scarichi interessati più frequentemente da carichi tossici. Dai risultati dei test eseguiti con *Daphnia magna* emerge una situazione piuttosto rassicurante sullo stato di qualità tossicologica delle acque reflue, in quanto solo l'8% dei campioni analizzati ha presentato valori non conformi rispetto ai limiti definiti nel D. Lgs. 152/06. Il comparto industriale è risultato quello interessato da maggiori problemi di tossicità, pertanto, le informazioni ecotossicologiche dovranno essere sfruttate per migliorare i processi di trattamento, in modo da limitare i possibili effetti negativi dell'impatto antropico sugli ecosistemi acquatici.

Keywords: Acque reflue, ecotossicologia, *Daphnia magna*, tossicità acuta, ecosistemi acquatici.

## Introduzione

Lo smaltimento dei reflui è ancora una delle problematiche più scottanti, connesse a fenomeni di contaminazioni ambientali con sempre nuovi inquinanti chimici. Con il recepimento di norme comunitarie e l'emanazione del D. Lgs. 152/99, si è iniziato a rivolgere particolare attenzione alla qualità degli scarichi, finalizzata soprattutto alla valutazione dell'impatto che i contaminanti possono avere sulle biocenosi dei corpi recettori. Il successivo D. Lgs. 152/06 e s.m.i., che costituisce la normativa vigente di riferimento per il controllo delle acque reflue prevede, infatti, un articolato programma di tutela dei corpi idrici recettori, da attuare sia attraverso il rispetto dei limiti per le concentrazioni delle diverse sostanze inquinanti, sia mediante attività di biomonitoraggio mirate a "quantificare" gli effetti dell'attività antropica sugli ecosistemi acquatici. In questo quadro legislativo, i bioindicatori utilizzati per i saggi di tossicità sono diventati, pertanto, un valido strumento di controllo, capace di fornire informazioni sulla biodisponibilità di sostanze tossiche e sulle possibili risposte degli organismi ai contaminanti ambientali, non deducibili con altri sistemi di indagine. L'integrazione delle determinazioni analitiche chimiche e microbiologiche con quelle ecotossicologiche, permette di valutare, in maniera più completa, il possibile impatto ambientale della fonte inquinante e di avere un quadro conoscitivo utile alla definizione di adeguati piani di salvaguardia degli ecosistemi e della salute umana.

## Materiali e metodi

Il crostaceo di acqua dolce *Daphnia magna* è un importante indicatore della qualità tossicologica delle acque reflue ed è in grado di fornire informazioni sugli effetti a breve termine, che il carico tossico può esplicare sugli organismi acquatici. Il saggio di tossicità acuta con *D. magna* viene eseguito secondo il metodo 8020 APAT CNR IRSA Manuale n. 29 2003. La prova consiste nell'esporre organismi di età inferiore alle 24 ore agli scarichi tal quali, in condizioni ambientali standardizzate, per 24 ore. Al termine dell'esposizione viene registrata l'immobilizzazione degli organismi utilizzati. L'effetto acuto indotto viene espresso come percentuale di immobilizzazione a 24 ore e per tutti i campioni positivi, con % di immobilizzazione superiori o uguali al 50% viene calcolata l'EC50 a 24h (concentrazione efficace sul 50% degli organismi saggiati), parametro che fornisce indicazioni quantitative del carico tossico presente nelle acque di scarico.

## Risultati

In questo lavoro sono stati presi in esame i dati analitici relativi a 2040 campioni di acque di scarico, analizzate da gennaio 2003 a dicembre 2013. Tali controlli hanno riguardato: acque reflue urbane, che rappresentano la quota prevalente, 1312 (64,3%), industriali 641 (31,4%), domestiche 13 (0,6%) e di origine zootecnica 74 (3,6%) (Fig.1). I reflui industriali analizzati appartengono a diverse tipologie, in particolare: cartiere, industrie di ceramica, galvaniche, stamperie, aziende alimentari, metalmeccaniche, olearie, distillerie, centrali elettriche, impianti di verniciatura, individuate dalle strutture territoriali come quelle che possono avere maggior impatto sulla qualità ambientale.

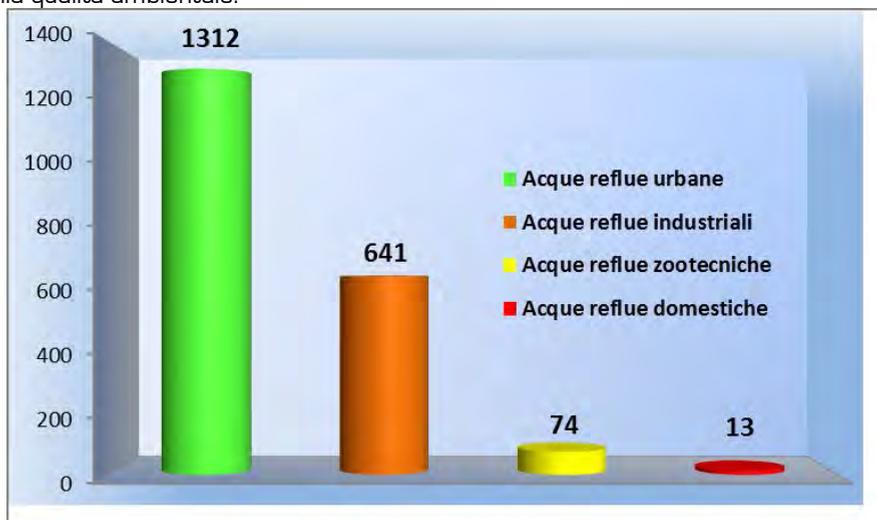
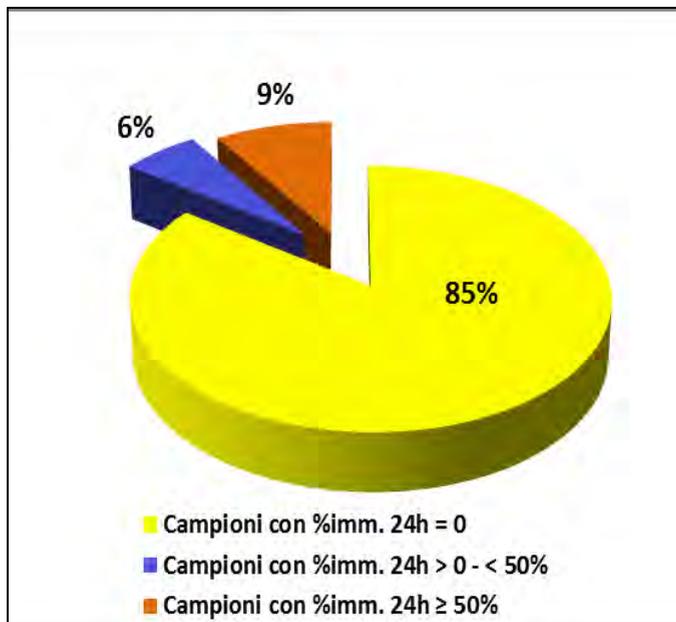


Figura 1. Distribuzione numerica delle diverse tipologie di acque reflue controllate negli anni dal 2003 al 2013.

In una quota rilevante dei campioni esaminati: 1733 (85%) non sono stati rilevati effetti di tossicità acuta in quanto il valore di immobilizzazione registrato a 24h per *D. magna* è risultato pari a 0%. In 124 campioni (6%) sono state registrate percentuali di effetto modeste, al di sotto del 50%, limite individuato dal D. Lgs.

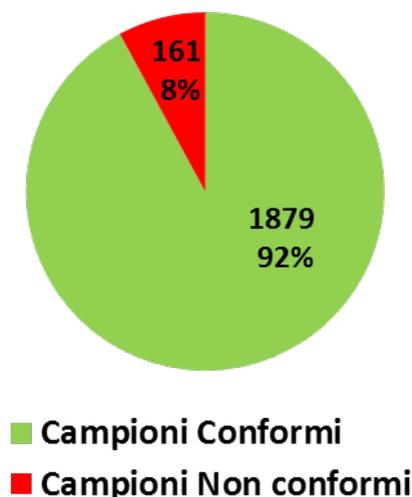
152/06, per gli scarichi immessi direttamente nei corpi recettori e sul suolo. Effetti di immobilizzazione superiori o uguali al 50% hanno interessato 183 campioni (9%) (Fig.2).



*Figura 2. Distribuzione percentuale dei campioni in base ai valori di immobilizzazione registrati per *D. magna*.*

Dei 183 campioni esaminati con percentuali di immobilizzazione superiori o uguali al 50%, solo 161 (8%) hanno presentato valori non conformi rispetto ai limiti definiti nel D. Lgs. 152/06. Dai risultati emerge, pertanto, che il carico tossico, capace di esplicare effetti di tipo acuto su *D. magna*, interessa una quota limitata di campioni, derivanti prevalentemente da attività produttive: 119 reflui industriali. Le acque reflue urbane trattate negli impianti di depurazione sono risultate tossiche in minor numero (40 reflui) e in maniera piuttosto saltuaria (Fig.3).

**119 reflui industriali**  
**40 reflui urbani**  
**2 reflui domestici**  
**9 reflui zootecnici**



*Figura 3. Distribuzione numerica e percentuale dei campioni in base alla conformità rispetto ai limiti del D.Lgs.152/06 e descrizione della tipologia dei Non conformi.*

### **Conclusioni e discussione**

Il quadro favorevole che emerge dall'analisi dei dati dei saggi ecotossicologici eseguiti con *D. magna* sugli scarichi, campionati sull'intero territorio umbro, non deve comunque fare abbassare la guardia sui controlli e sull'applicazione delle migliori tecnologie disponibili per l'abbattimento delle sostanze tossiche, soprattutto nel settore industriale. Le indagini ecotossicologiche, condotte in maniera mirata, continueranno a rappresentare sicuramente un importante strumento di supporto per la valutazione dell'efficienza dei processi depurativi e per la scelta di strategie di salvaguardia e tutela dei corpi idrici recettori e dei suoli sui quali vengono smaltite le acque reflue. Sarebbe auspicabile, inoltre, un'evoluzione dei criteri normativi adottati a livello nazionale per la valutazione dell'accettabilità degli scarichi in base ai requisiti tossicologici. In particolare risulta importante una revisione della regolamentazione dello smaltimento delle acque reflue che tenga conto, per la valutazione dell'impatto ambientale, sia della portata dello scarico, che delle caratteristiche idrologiche e qualitative del corpo recettore. L'ammissibilità dello scarico dovrebbe inoltre essere valutata, anche mediante saggi di tossicità cronica, in quanto gli effetti a medio e lungo termine, non immediatamente percepibili, rappresentano sicuramente la forma più insidiosa per la destabilizzazione della struttura e del funzionamento degli ecosistemi.

### **Bibliografia**

Metodo Analitici per le acque- 8020. Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* APAT CNR IRSA Manuale n. 29 2003.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories.  
Decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, Norme in materia ambientale.  
Direttiva quadro sulle Acque 2000/60/CE.

# SAGGI BIOLOGICI SUI SEDIMENTI MARINO COSTIERI DELLA TOSCANA AL FINE DI IDENTIFICARE LA MATRICE SULLA QUALE EFFETTUARE LA VALUTAZIONE DELLA CLASSE DI QUALITÀ AMBIENTALE: ANNI 2012-2013

di G. Benedettini<sup>a</sup>, R. Manzione<sup>a</sup>, F. Vigna Guidi<sup>a</sup>, D. Verniani<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ARPAT - g.benedettini@arpat.toscana.it

---

**Abstract** -Gli esiti del monitoraggio sulle acque marino costiere effettuati negli anni 2010-2012 hanno evidenziato superamenti di alcune sostanze della tabella 2/A dell'allegato 1 alla parte III del d.Lgs 152/2006 e smi (in particolare DM 26/10) sia nei sedimenti che nella colonna d'acqua. Al fine del controllo delle alterazioni riscontrate, il monitoraggio annuale dei sedimenti è stato pianificato includendo anche test di tossicità finalizzati ad evidenziare eventuali effetti eco-tossicologici a breve e lungo termine. Tale monitoraggio è stato effettuato per la prima volta nel 2012 e ripetuto nel 2013.

La classificazione dei sedimenti è stata effettuata secondo i criteri stabiliti nel "Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini" - APAT ICRAM (2007).

Gli organismi scelti appartengono a tre livelli trofici differenti: saprofiti (*Vibrio fischeri*), produttori primari (*Phaeodactylum tricorutum*) e filtratori (*Brachinus plicatilis*), come richiesto dalla normativa. I saggi di tossicità acuta sono stati eseguiti su 14 stazioni rappresentative di 14 corpi idrici. Su quattro di queste è stato, inoltre, eseguito il test cronico (14d) con *Artemia franciscana*. Le analisi eco-tossicologiche sono state effettuate sull'elutriato al fine di valutare la presenza di tossici idrosolubili.

I saggi di tossicità acuta effettuati con *V. fischeri* e con *B. plicatilis* sono risultati negativi in tutti i campioni analizzati, mentre l'alga unicellulare *P. tricorutum*, che nel 2012 aveva evidenziato una situazione di tossicità media in 3 stazioni nel 2013 indica assenza di tossicità in tutte le stazioni monitorate. Il test di tossicità cronica con *A. franciscana* ha dato esito negativo in tutti i campioni analizzati.

In seguito a tali risultati, la Regione Toscana ha dato mandato a ARPAT di effettuare uno studio (in corso) per la definire i valori di fondo naturali nei sedimenti e nelle acque marino costiere.

Keywords: Ecotossicologia, sedimenti marini, classe di qualità

## Introduzione

Gli esiti del monitoraggio sulle acque marino costiere effettuati negli anni 2010-2012 hanno evidenziato superamenti di alcune sostanze della tabella 2/A dell'allegato 1 alla parte III del d.Lgs 152/2006 e smi (in particolare DM 26/10) sia nei sedimenti che nella colonna d'acqua. Al fine del controllo delle alterazioni riscontrate, secondo quanto previsto dall'allegato 1, lettera A.2.6.1 del Decreto 8 novembre 2006, n. 260, il monitoraggio annuale dei sedimenti è stato pianificato includendo anche test di tossicità finalizzati ad evidenziare eventuali effetti ecotossicologici a breve e lungo termine. Tale monitoraggio, così come previsto dalla norma, è stato

effettuato per la prima volta nel 2012 e poi successivamente ripetuto nell'anno 2013.

### **Materiali e metodi**

Gli organismi scelti appartengono a tre livelli trofici differenti: saprofiti (*Vibrio fischeri*), produttori primari (*Phaeodactylum tricornutum*) e filtratori (*Brachionus plicatilis*), come richiesto dalla normativa. I saggi di tossicità acuta sono stati eseguiti sui sedimenti prelevati da 14 stazioni rappresentative dei 14 corpi idrici (Marina di Carrara, Nettuno, Fiume Morto, Livorno, Rosignano, Salivoli, Carbonifera, Foce Bruna, Foce Ombrone, Cala di Forno, Foce Albegna, Porto S. Stefano, Ansedonia, Mola). Sui sedimenti di quattro stazioni (Livorno, Rosignano, Porto S. Stefano, Mola) che avevano mostrato maggior criticità è stato inoltre eseguito il test cronico con *Artemia franciscana*. Le analisi ecotossicologiche sono state effettuate sull'elutriato al fine di valutare la presenza di tossici idrosolubili.

#### **Tossicità acuta con *Vibrio fischeri***

Il metodo (APAT IRSA CNR 8030 Manuale 29/03: 2003) consente di valutare la tossicità acuta di campioni utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri* dopo un tempo di contatto di 30 minuti con il campione in esame.

#### **Tossicità acuta con il rotifero *Brachionus plicatilis***

Il saggio si basa sulla valutazione della mortalità del rotifero *Brachionus plicatilis* (Halbach et al., 1983) in presenza di fonti di stress, rispetto ad un controllo. Il saggio è stato condotto secondo il protocollo sperimentale (Snell, Persoone, 1989) fornito da Microbiotests Inc. produttrice del Rotoxkit test (secondo SOP del Rotoxkit M della ditta MicroBioTests Inc.).

#### **Test di inibizione della crescita con l'alga marina *Phaeodactylum tricornutum***

Le modalità di determinazione della inibizione della crescita dell'alga unicellulare marina *Phaeodactylum tricornutum* sono descritte nel metodo UNI EN ISO10253: 2006.

#### **Determinazione della tossicità letale a 14 giorni con *Artemia franciscana* (Crustacea: Anostraca)**

La determinazione della tossicità letale a lungo termine nei confronti del crostaceo marino *Artemia franciscana* (Crustacea: Anostraca) viene eseguito secondo il metodo UNICHIM M.U. 2244:12. Questo metodo prevede la determinazione della concentrazione o diluizione che, in 14 giorni, causa la morte del 50% degli organismi esposti (EC<sub>50</sub> a 14d). Il saggio è semistatico, con rinnovo delle soluzioni di prova ed alimentazione degli organismi effettuata ad intervalli definiti (2, 5, 7, 9, 12 giorni). Per l'alimentazione degli organismi è utilizzata una sospensione della microalga *D. tertiolecta* con una densità di 10<sup>8</sup> cellule/mL.

#### **Classe di tossicità in funzione della specie utilizzata nel saggio ecotossicologico**

In Tabella 1 si riporta un estratto dalla tabella inserita nel documento APAT ICRAM (2007) - "Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini" ai fini della classe di tossicità dei sedimenti marini in funzione della specie utilizzata nel saggio ecotossicologico. Il criterio di classificazione ecotossicologica si basa sul risultato peggiore riscontrato sul singolo campione.

*Tabella 1. Classe di tossicità in funzione della specie utilizzata nel saggio ecotossicologico*

Specie test	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità media	Tossicità alta	Tossicità molto alta
<i>Pheodactylum tricornutum</i>	$EC_{20} \geq 90\%$	$EC_{20} < 90\%$ e $EC_{50} > 100\%$	$40\% \leq EC_{50} < 100\%$	$EC_{50} < 40\%$
<i>Brachionus plicatilis</i>	$EC_{20} \geq 90\%$	$EC_{20} < 90\%$ e $EC_{50} > 100\%$	$40\% \leq EC_{50} < 100\%$	$EC_{50} < 40\%$
<i>Vibrio fischeri</i>	$EC_{20} \geq 90\%$	$EC_{20} < 90\%$ e $EC_{50} \geq 90\%$	$20\% \leq EC_{50} < 90\%$	$EC_{50} < 40\%$

### Risultati

Sono stati eseguiti 14 campionamenti in stazioni rappresentative di ciascun corpo idrico con particolare attenzione alle stazioni che avevano fatto registrare il maggior numero di superamenti di alcune sostanze della tabella 2/A dell'allegato 1 alla parte III del d.Lgs 152/2006 e smi (in particolare DM 260/10). Le stazioni in cui è stato eseguito il test cronico sono quelle che avevano mostrato maggior criticità.

**2012** - I tests di tossicità hanno indicato che 3 sedimenti sono classificabili con una tossicità media (foce Albegna, Ansedonia, Mola) e 11 con tossicità assente o trascurabile (vedi Tabella 2).

**2013** - I tests di tossicità hanno indicato che tutti classificabili con una tossicità assente o trascurabile (vedi Tabella 2).

I saggi di tossicità acuta effettuati con *Vibrio fischeri* e con *Brachionus plicatilis* e di tossicità cronica con *Artemia franciscana* sono risultati negativi in tutti i campioni analizzati.

Tabella 2.

Anno monitoraggio	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità media
2012	11 campioni	3 campioni
2013	14campioni	0 campioni

### Discussione e conclusioni

I saggi di tossicità acuta effettuati con *Vibrio fischeri* e con *Brachionus plicatilis* e di tossicità cronica con *Artemia franciscana* sono risultati negativi in tutti i campioni analizzati.

L'organismo più sensibile è risultato l'alga unicellulare *Phaeodactylum tricornutum*. Premesso quanto sopra, è opportuno ricordare, come risulta dalla relazione ARPAT sul monitoraggio delle acque marino costiere relativa al triennio 2010-2012, che per tutti i 14 corpi idrici della Toscana la classificazione dello stato chimico risulta non buona sia basandoci sulle acque (superamento nei limiti per Hg e TBT) sia sui sedimenti (superamento nei limiti per As, Cr, Cd, e Ni e per alcune stazioni anche superamento di Hg, benzo[ghi]perilene, benzo[a]pirene, benzo[b]fluorantene, benzo[k]fluorantene e TBT). Lo stato ecologico risulta invece mediamente buono.

I tests biologici effettuati a tre livelli trofici diversi però ci rassicurano sulla loro effettiva tossicità ambientale.

In seguito a tali risultati, la Regione Toscana ha dato mandato a ARPAT di effettuare uno studio (in corso) per definire i valori di fondo naturali nei sedimenti e nelle acque marino costiere.

### ***Ringraziamenti***

Gli autori desiderano ringraziare gli operatori ARPAT del Settore Mare e del Settore Laboratorio AVL .

### ***Bibliografia***

- APAT-ICRAM. 2007 Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini.  
APAT IRSA CNR. 2003 Manuale 29/03; metodo 8030.  
Halbach U., M. Wiwbert, M. Westermayer, C. Wissel. 1983 Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotox. Envir. Safety* 7: 484-513  
d.Lgs 152/2006. 2006. Norme in materia ambientale  
DM 260/10. 2010 Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali - Modifica norme tecniche Dlgs 152/2006  
Snell T.W., G. Persoone. 1989 Acute toxicity bioassays using rotifers.I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic toxicology* 14: 65-80  
UNICHIM M.U. 2244. 2012 Determinazione della tossicità letale a 14 giorni con *Artemia franciscana* [Crustacea: Anastroca]  
UNI EN ISO10253: 2006 Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* end *Phaedactylum tricornutum*

# MUTAGENICITÀ DELLE ACQUE REFLUE URBANE DEPURATE

di T. Leoni<sup>A</sup>, M. Fioretti<sup>A</sup>, L. Liuti<sup>A</sup>, S. Sarcina<sup>A</sup>, A. Valenti<sup>A</sup>

<sup>A</sup> ARPAM, Dipartimento provinciale di Macerata - tristano.leoni@ambiente.marche.it

---

**Abstract** – E' stata valutata la mutagenicità delle acque reflue urbane in entrata e in uscita da due grandi impianti di trattamento aventi potenzialità prossima a 100.000 A.E. dei quali uno utilizza ipoclorito di sodio, l'altro acido peracetico nella fase di disinfezione. La mutagenicità è stata valutata con il test di Ames utilizzando ceppi TA 98 e TA 100 di *Salmonella thyphimurium* in presenza ed in assenza di attivazione metabolica (S9 mix). I campioni, acidificati fino a pH 2.5, sono stati preventivamente estratti in fase solida con resine C18 trifunzionali e concentrati. Sono stati considerati positivi i campioni che hanno evidenziato come minimo il raddoppio dei revertenti in almeno una delle concentrazioni saggiate e per i quali è stato possibile evidenziare una relazione dose/risposta. I concentrati sono stati inoltre analizzati in GC-MS al fine di individuare eventuali correlazioni tra attività mutagena e presenza di determinate classi di composti, sia prima che dopo i trattamenti di disinfezione. La caratterizzazione chimica dell'eluato è stata eseguita in *electron ionization* (EI), acquisendo in *full scan* da m/z 40 fino a m/z 650. Sono stati confrontati gli spettri di massa acquisiti per bianchi, campioni trattati e non: il criterio generale adottato per identificare un composto prodotto a seguito del trattamento chimico di disinfezione del refluo, è stato la presenza, nello spettro del campione trattato, di un segnale di intensità almeno doppia rispetto a quello del corrispondente nei bianchi e nei campioni non trattati.

I risultati evidenziano alcune differenze sia in merito alle caratteristiche delle acque reflue in ingresso che agli effetti derivanti dai due tipi di trattamento.

Keywords: ecotossicità, test di Ames, acque reflue, ipoclorito di sodio, acido peracetico

## Introduzione

I test di mutagenesi a breve termine vengono da tempo utilizzati per la valutazione dei rischi mutageno-cancerogeni per l'uomo derivanti dall'esposizione a diversi composti chimici e la loro applicazione si è estesa anche alla ricerca di sostanze mutagene in matrici complesse, quali acqua, aria, suolo e alimenti. Da tempo ampiamente utilizzati per lo studio delle acque potabili (Monarca et al., 1998; Helma et al., 1994), tali test sono stati impiegati meno frequentemente per le indagini sulle acque reflue urbane. Il trattamento di quest'ultime prevede di norma una fase di disinfezione prima dello scarico delle acque depurate al fine di mitigare il rischio sanitario correlato, generalmente mediante l'utilizzo di ipoclorito di sodio. Tuttavia, è ampiamente dimostrato che i composti del cloro reagiscono con le sostanze organiche presenti in notevole quantità nelle acque, generando un elevato numero di derivati cloro-organici, alcuni dei quali mostrano attività mutagena e/o cancerogena (Rook et al. 1974; Richardson et al., 1998; WHO, 1996; Cantor, 1997; Koivusalo and Vartiainen, 1997; Monarca et al., 2004). Considerate le ingenti quantità di liquami in uscita dal trattamento depurativo e tenuto conto della concentrazione di disinfettante normalmente utilizzato, può essere rilevante la quantità di composti organoalogenati

che pervengono nell'ambiente, in particolare nelle acque superficiali, a seguito dei trattamenti di disinfezione delle acque reflue con i composti del cloro. In tal senso la Regione Marche ha previsto nel proprio piano di tutela delle acque, un progressivo abbandono di tale modalità di disinfezione a favore di disinfettanti alternativi privi di cloro. Per valutare l'entità della problematica legata alla liberazione dei suddetti composti, nonché l'eventuale miglioramento indotto dall'utilizzo di disinfettanti alternativi, è stata valutata la mutagenicità delle acque reflue urbane in entrata ed in uscita da due grandi impianti di trattamento aventi potenzialità prossima a 100.000 A.E. dei quali uno utilizza ipoclorito di sodio, l'altro acido peracetico nella fase di disinfezione.

### ***Materiali e metodi***

La mutagenicità è stata valutata con il test di Ames secondo quanto previsto da "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater ed 22st 2012 - Metodo 8030" utilizzando ceppi TA 98 e TA 100 di *Salmonella thyphimurium* in presenza e in assenza di attivazione metabolica (S9 mix). Il test è presente nell'elenco delle prove accreditate da ACCREDIA per il laboratorio multisito ARPAM con numero di accreditamento O271. I campioni di acque reflue (5 L), acidificati fino a pH 2.5, sono stati preventivamente estratti in fase solida utilizzando un estrattore automatico con resine C18 trifunzionali, in accordo con il metodo EPA 525 (revisione 3, 2012). Gli eluati sono stati concentrati fino a secchezza in leggero flusso di N<sub>2</sub> e ripresi con 1 mL di DMSO.

Il test di Ames è stato condotto saggiando dosi crescenti di estratto (C1 = 0.07 L, C2 = 0.28 L, C3 = 0.72 L). E' stata preparata una brodocoltura *overnight* dei ceppi test a 37 ± 1°C in bagnomaria, con agitazione a 210 rpm per 12 ore. L'incorporazione in piastra è stata eseguita in tre repliche, su agar minimale con l'aggiunta di top agar e tampone fosfato o S9 mix per l'attivazione metabolica, L'incubazione è stata condotta in incubatore a secco alla temperatura controllata mediante *data logger* di 37 ± 1°C per 48 ore. La lettura delle piastre è stata effettuata mediante conta diretta delle colonie revertenti di *Salmonella*, considerando sia le colonie superficiali, che il background di fondo.

I dati sono stati espressi come rapporto di mutagenicità (RM), considerando la media del numero di colonie in ogni concentrazione:

$$RM = \frac{(\text{colonie mutate campione} - \text{colonie mutate controllo negativo})}{\text{colonie mutate controllo negativo}}$$

Sono stati considerati positivi i campioni che hanno evidenziato come minimo il raddoppio dei revertenti in almeno una delle concentrazioni saggiate e per i quali è stato possibile evidenziare una relazione dose/risposta.

Contemporaneamente, le acque reflue prelevate sono state analizzate in GC-MS con la tecnica 'Purge & Trap' per la determinazione dei VOCs. Altri 2L di campione sono stati utilizzati, invece, per la caratterizzazione chimica di composti semi-volatili: si è proceduto, come indicato dal metodo EPA 525.3, ad una estrazione in fase solida con l'ausilio di Supelclean ENVI-18 SPE Tubes, 500mg/6mL (Supelco). All'eluato sono stati addizionati TPP e DEHP-d4 in qualità di standard interni, prima di procedere alla concentrazione fino a volume di 200µL. L'analisi strumentale è stata eseguita in EI-GC-MS a flusso costante di 1mL/min, iniettando 2µL dell'estratto concentrato e impiegando una colonna cromatografica J&W HP-5MS (30m x 0.25mm; 0.25µm).

L'acquisizione è stata fatta in *full scan* da m/z 40 fino a m/z 650. La temperatura iniziale del forno era di 35°C ed è stata mantenuta per 3 minuti, dopo di che è stata incrementata di 9°C/min fino a raggiungere 230°C; gli ultimi 30 minuti della corsa cromatografica sono stati effettuati in isoterma a 230°C; la durata complessiva della corsa è stata di 62 minuti. Le temperature della *transfer line*, dell'iniettore e della trappola sono state impostate, rispettivamente, a 270°C, 290°C e 230°C. In diverse prove indipendenti, 2L di acqua ultrapura sono stati processati come precedentemente descritto al fine di allestire dei bianchi campione. Sono stati confrontati gli spettri di massa acquisiti per bianchi, campioni trattati e non. Il criterio generale adottato per identificare un composto prodotto a seguito del trattamento chimico di disinfezione del refluo, è stato la presenza, nello spettro del campione trattato, di un segnale d'intensità almeno doppia rispetto a quello del corrispondente nei bianchi e nei campioni non trattati.

### **Risultati**

I risultati delle prove sperimentali indicano che, per quanto riguarda la mutagenicità, la risposta più evidente si è avuta utilizzando il ceppo TA98 in assenza di attivazione metabolica, per cui solo questi verranno esposti e discussi.

In Tabella 1 sono indicati i valori sperimentali dei revertenti, in funzione della dose, ottenuti in due prove separate compiute in differenti impianti di depurazione che effettuano trattamenti delle acque reflue con ipoclorito di sodio e con acido peracetico.

I valori delle singole prove sono stati utilizzati per calcolare i corrispondenti valori di RM, in base alla formula riportata nella sezione 'Materiali e Metodi'.

*Tabella 1. Revertenti prima e dopo il trattamento di disinfezione*

Dose (L)	Campagna	Ipoclorito pre	Ipoclorito post	Peracetico pre	Peracetico post
0,07	I	17	15	30	16
0,07	II	20	17	23	22
0,28	I	11	22	56	43
0,28	II	13	23	12	15
0,72	I	10	34	15	24
0,72	II	15	32	12	21

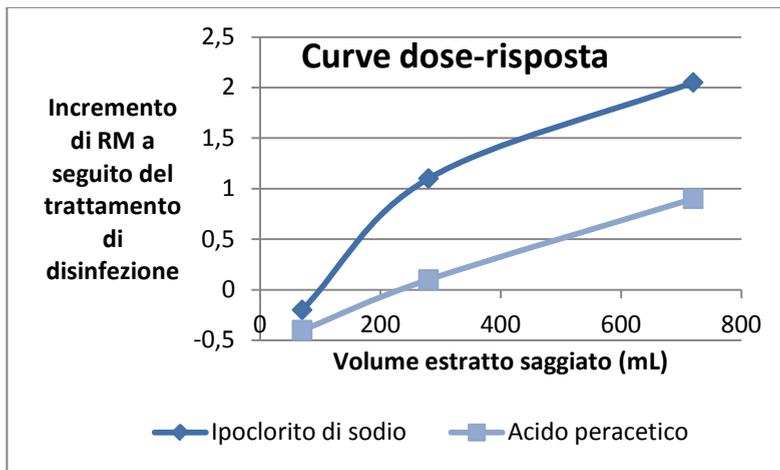
Si è, quindi, proceduto a calcolare il valore medio degli RM pre- e post-trattamento ai tre livelli di dose saggiata nel test, aggregando per tipologia di trattamento. Questi risultati sono riassunti in Tabella 2.

*Tabella 2. Valore medio del rapporto di mutagenicità RM prima e dopo il trattamento di disinfezione*

Dose (L)	Ipoclorito pre	Ipoclorito post	Peracetico pre	Peracetico post
0,07	0.26	0.06	0.80	0.26
0,28	0.20	1.30	0.30	0.40
0,72	0.25	2.30	0.40	1.30

Plottando in un sistema di assi cartesiano-ortogonali, in ascissa il volume di estratto utilizzato per allestire le prove di mutagenicità e in ordinata la differenza che si ottiene, per ciascun trattamento di disinfezione, tra il valore di RM post e quello pre-trattamento, sono state costruite le due curve di Figura 1.

Figura 1 – Curva dose-risposta: rapporto di mutagenicità vs dose di estratto



L'andamento è tipico delle curve dose-risposta e indica come, nelle prove condotte, il rapporto di mutagenicità tenda ad aumentare in maniera direttamente proporzionale alla quantità di estratto utilizzata nei test di mutagenicità. RM cresce in modo più repentino quando il test di Ames viene condotto a partire da estratti di acque reflue sottoposte al trattamento di clorazione mentre sale in maniera più blanda nei test condotti con reflui trattati con acido peracetico. I risultati sperimentali evidenziano, pertanto, un'attività mutagenica più marcata per l'ipoclorito di sodio rispetto al perossiacido organico.

L'osservazione relativa ai diversi effetti ascrivibili ai differenti trattamenti eseguiti, trova conferma anche nella rielaborazione statistica dei dati ottenuti per i revertenti (considerando tutte le prove eseguite). La normalità delle distribuzioni dei dati relativi ai revertenti pre-trattamento con ipoclorito, di quelli post-trattamento di clorazione, di quelli pre-trattamento con acido peracetico e, infine, di quelli post-trattamento con il perossiacido, è stata verificata con il test di Shapiro-Wilks mentre l'assenza di dati anomali è stata analizzata con il test di Dixon, entrambi al livello di significatività del 95%,

Per evidenziare se esiste una differenza tra i revertenti ottenuti prima e dopo il trattamento con l'agente chimico disinfettante, è stato eseguito un t-test a due code per dati appaiati, anch'esso al livello fiduciario del 95%. I risultati ottenuti sono schematizzati nella rappresentazione box-plot di Figura 2.

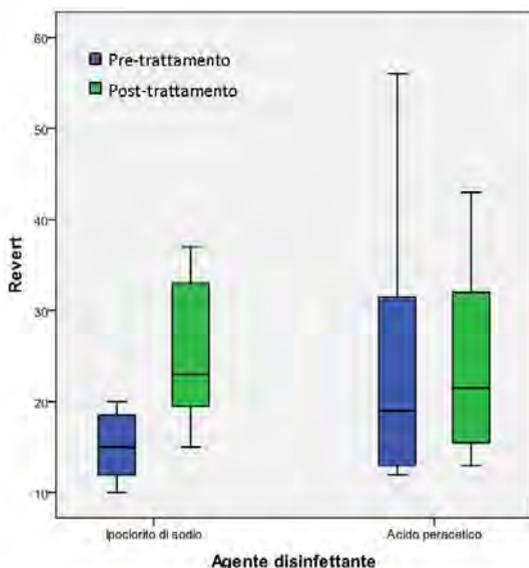


Figura 2 - Rappresentazione box-plot dei revertenti

Il t-test ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ( $p=0,02$ ) tra i revertenti ottenuti prima e dopo il trattamento delle acque reflue con ipoclorito di sodio, dimostrando come il trattamento di disinfezione contribuisca in maniera significativa a far aumentare il numero dei revertenti ed sottolineando un incremento della mutagenicità delle specie chimiche presenti in uscita. La medesima differenza non si riscontra trattando le acque reflue con acido peracetico ( $p=0,97$ ). In generale, nelle prove condotte negli impianti che utilizzano il perossiacido, si è assistito a un più elevato livello di mutagenicità delle acque in ingresso (se paragonato a quello delle acque in ingresso all'impianto di clorazione, anche se questa differenza non è corroborata da significatività statistica) e tale livello di mutagenicità viene debolmente incrementato a seguito del trattamento di disinfezione.

Per quanto concerne la caratterizzazione chimica dei campioni è stato possibile evidenziare come il processo di clorazione produca un maggior numero di sostanze pericolose, quali, ad esempio, alometani, acidi aloacetici, aloaldeidi e clorofuranoni, rispetto al trattamento con acido peracetico che invece ha generato aldeidi non alogenati (in particolare nonanale e decanale) e derivati benzenici a minor impatto per la salute. Anche l'analisi dei composti organici volatili ha condotto a risultati analoghi: solo nei reflui in uscita dall'impianto che utilizza ipoclorito di sodio si è assistito, infatti, ad un aumento di alcuni agenti chimici pericolosi che si sviluppano a seguito delle operazioni di clorazione delle acque reflue, come ad esempio quelli elencati in Tabella 3 che, a livello internazionale, sono classificati come potenziali agenti cancerogeni e/o mutageni.

Tabella 3 - Classificazioni GHS (incompleta) e IARC (ultimo aggiornamento 20/10/14) di alcuni inquinanti ritrovati nei reflui trattati con ipoclorito di sodio.

Agente chimico	Classificazione GHS	Classificazione
Cloroformio	Cancerogeno, Cat. 2; H351	2 B
Bromodichlorometano	Cancerogeno; Cat. 2; H351	2 B
Dibromoclorometano	Mutageno, Cat. 2; H341	3

## *Discussione*

L'analisi dei risultati ottenuti in ciascuna delle quattro condizioni operative previste dal test di Ames (TA98/100 con e senza attivazione metabolica), ha permesso di stabilire che è il ceppo TA98 quello che ha fatto registrare un significativo incremento del numero dei revertenti, in assenza di attivazione metabolica e nel caso di utilizzo dell'ipoclorito di sodio.

Tale comportamento è in accordo con i dati prodotti da altri autori e sembrerebbe essere tipico nel caso in cui il disinfettante sia l'ipoclorito e non vi sia la contemporanea presenza di sostanze negli scarichi in ingresso già dotate di propria e specifica attività mutagena diretta o indiretta.

Nessuna attività significativa è stata, invece, rilevata nei campioni trattati con acido peracetico in nessuna delle condizioni operative previste dal test.

In ogni caso, a prescindere dal tipo di positività registrata, sul fronte quantitativo si fa notare come l'entità dell'effetto rilevato sia stato più basso di quello atteso, soprattutto in raffronto con i risultati da noi ottenuti con campioni di acque potabili nei quali la quantità di sostanza organica presente era decisamente inferiore a quella presente nelle acque reflue. Anche per quanto riguarda la concentrazione delle molecole alozenate venutesi a formare a seguito del trattamento di disinfezione con ipoclorito, non sono stati evidenziati incrementi decisamente consistenti, per cui l'attenzione potrebbe essere posta anche su altre classi di composti.

In effetti vi sarebbe la necessità di implementare le classi di composti indagati prevedendo, ad esempio, lo studio dei composti alo-idrossilbenzochinoni, i quali sono sospetti cancerogeni e possono essere determinati in LC-MS, dal momento che Wang et al. hanno recentemente dimostrato che vengono anch'essi prodotti durante i trattamenti di disinfezione.

## *Conclusioni*

Con questo lavoro si è voluto porre l'attenzione su una problematica nota, forse ancora non dettagliatamente indagata, che può però avere notevole importanza per le indicazioni che fornisce in merito alla qualità dell'ambiente e alla qualità della vita all'interno dei diversi habitat.

Il nostro studio ha mostrato e riconfermato la possibilità che si generino composti genotossici nel corso del processo di disinfezione. Questa capacità dipende dalla natura chimica del disinfettante utilizzato, dal suo dosaggio e dal carico inquinante del reflu ed è significativa nel caso in cui si utilizzi ipoclorito.

La propensione all'abbandono di questo disinfettante nei processi di disinfezione delle acque reflue urbane, manifestata anche nel Piano di Tutela della Acque della Regione Marche, e sentita anche per tutti i processi industriali che utilizzano grandi quantità di tale composto, dovrebbe essere più attentamente considerata anche alla luce dei rapporti costi/benefici legati alla interruzione di tale pratica a favore di altre apparentemente meno impattanti.

Sulla base dei dati comunque parziali del nostro lavoro, si ritiene in ogni caso che l'attività genotossica rilevata nelle acque reflue urbane sottoposte a disinfezione, pur con i limiti sopra rappresentati, descriva un potenziale problema ecologico e sanitario che dovrebbe essere tenuto in maggiore considerazione.

## ***Bibliografia***

- Ames B. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22<sup>nd</sup> Edition 2012. *Mutagenesis* 8030; 8:31-37.
- Cantor KT. Drinking water and cancer. 1997. *Cancer Causes Control* 1997; 8:292-308.
- Helma C, Sommer R, Schulte-Herman R, Knasmüller S. Enhanced clastogenicity of contaminated groundwater following UV irradiation detected by the Tradescantia micronucleus assay. *Mutation Res.* 1994; 323:93-98.
- Hrudey SE Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. *Water Research* 2009; 43(8):2057–2092.
- Koivusalo M, Vartiainen T. Drinking water chlorination by-products and cancer. *Rev. Environ. Health* 1997; 12:81-90.
- Leoni T, Cambriani M. Mutagenicità di acque potabili prelevate prima e dopo il trattamento di disinfezione, nonché lungo la rete di distribuzione. In *Atti del Convegno Nazionale di Ecotossicologia*, Torino, 07/07/2000.
- Monarca S, Feretti D, Collivignarelli C, Guzzella L, Zerbini I, Bertanza G. & Pedrazzani R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research* 2000; 34:42-61.
- Monarca S, Zanardini A, Feretti D, Dalmiglio A, Falistocco E, Manica P, Nardi G. Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests. *Water Res.* 1998; 32:2689-2695.
- Monarca S, Zani C, Richardson SD, Thruston AD, Moretti M, Feretti D, Villarini M. A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. *Water Research* 2004; 38:3809-3819.
- Richardson SD. 1998 In: Meyers RA (Ed), *Drinking water disinfection by-products*. Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation, vol.3. Wiley, New York.
- Rook JJ. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *J Water Treat. Examin* 1974; 23:234-243.
- United States environmental Protection Agency. Fed. Regist. 2006, 71:388-493.
- US EPA (2012) Method 525.3 Determination of semivolatile organic chemicals in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). EPA/600/R-12/010, Version 1.0, February 2012. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA
- Villanueva CM, Cantor KP, Cordier S, Jaakkola JJK, King WD, Lynch CF, Porru S, Kogevinas M. Disinfection byproducts and bladder cancer: a pooled analysis. *Epidemiology* 2004; 15:357-367.
- Wang W, Qian Y, Li J, Moe B, Huang R, Zhang H, Hrudey SE, Li XF. Analytical and Toxicity Characterization of halo-hydroxyl-benzoquinones as stable halobenzoquinone disinfection byproducts in treated water. *Analytical Chemistry* 2014; 86:4982-4988.
- WHO, 1996. Guidelines for Drinking-Water Quality. Health Criteria and Other Supporting Information. 2<sup>nd</sup> ed. World Health Organization, Geneva, CH.

# I RICCI DI MARE NELLA RICERCA ECOTOSSICOLOGICA, POSSIBILI STRATEGIE PER LA DISPONIBILITÀ CONTINUA DI GAMETI. RISULTATI PRELIMINARI

di Sonia Manzo<sup>a</sup>, Paola Cirino<sup>b</sup>, Simona Schiavo<sup>c</sup>, Maria Oliviero<sup>c</sup>, Martina Ciaravolo<sup>d</sup>, Angela Paglialonga<sup>b</sup>

<sup>a</sup> ENEA, CR Portici (Napoli) - sonia.manzo@enea.it

<sup>b</sup> Stazione Zoologica di Napoli A. Dohrn - paola.cirino@szn.it

<sup>c</sup> Università Napoli Federico II-ENEA,CR Portici (Napoli)

<sup>d</sup> Università Napoli Federico II-Stazione Zoologica di Napoli A. Dohrn

---

## Abstract

Gli echinodermi rappresentano dei validi modelli sperimentali nell'ambito dell'eco tossicologia marina. I saggi di tossicità con echinoidi sono caratterizzati da un'alta sensibilità e rilevanza ecologica, in quanto vengono impiegati i processi più sensibili del ciclo di sviluppo, come la fecondazione e sviluppo embrionale.

In questo studio si valuta e discute una strategia alternativa all'utilizzo di animali "wild" di *Paracentrotus lividus*, analizzando la qualità, tramite saggi di fecondazione e di sviluppo embrionale, dei gameti ottenuti da organismi stabulati secondo diversi protocolli, basati sulla variazione di due parametri fondamentali per la riproduzione di questa specie: temperatura e dieta. Nella maggioranza dei casi il tasso di fecondazione non risulta modificato nelle diverse categorie, mentre una discreta variabilità si manifesta nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Dai risultati preliminari emergono informazioni utili alla definizione di protocolli di stabulazione adatti alla produzione di gameti efficaci per l'indagine eco tossicologica.

Keywords: *Paracentrotus lividus*, gameti; stabulazione; temperatura; dieta.

## Introduzione

L'utilizzazione del riccio di mare *Paracentrotus lividus* in studi tossicologici risale agli anni 1950-1960, a partire dai lavori di Wilson (1951) e Bougjs (1959), che ne proposero l'uso degli embrioni in saggi di tossicità. Negli anni '70 gli embrioni e i gameti di riccio di mare furono proposti come indicatori dell'inquinamento marino (Kobayashi 1971;1972; Kobayashi et al.,1974) e come strumenti per valutare l'azione tossica di farmaci e di contaminanti ambientali (Hagström e Lønning 1973). Da allora, numerosi gruppi di ricerca hanno confermato l'utilizzo del riccio mare negli studi ecotossicologici (Dinnel et al., 1981; Pagano et al.,1986). L'interesse di questo modello risiede nella possibilità di poterne studiare vari stadi di sviluppo (dalla fecondazione all'animale adulto), dosando così la tossicità dell'agente. Inoltre, possono essere valutati una serie di eventi biologici, incluso il successo riproduttivo, l'embriogenesi e l'attività mitotica. Quindi un saggio biologico, con il riccio di mare può fornirci un set di dati multiparametrici sull'azione biologica della sostanza tossica in questione (Pagano et al., 1986).

La disponibilità di gameti e larve, con elevata qualità e bassa variabilità biologica ed indipendente dal ciclo riproduttivo stagionale, è un fattore chiave per garantire l'affidabilità e la riproducibilità di biosaggi.

Una limitazione legata all'utilizzo di diversi modelli animali, incluso il riccio di mare, è proprio la stagionalità del loro ciclo riproduttivo che impedisce la disponibilità di gameti tutto l'anno.

Il condizionamento fuori stagione dei riproduttori potrebbe essere una strategia utile per superare questo *bottleneck*.

I principali fattori che influenzano il ciclo gametogenico sia in *P. lividus* che in altre specie di ricci di mare, sono la temperatura, la disponibilità di cibo ed il fotoperiodo.

La temperatura è considerato il fattore chiave nel metabolismo e nel ciclo riproduttivo di *P. lividus* in coltura (Spirlet et al., 2000). In particolare È stato osservato che il decremento ed i bassi valori di temperatura possono rappresentare uno "stress naturale" che induce tali organismi ad immagazzinare nutrienti, che è il primo passo per la crescita gonadica e la gametogenesi, mentre valori elevati di temperatura inducono un calo della crescita fino a fermarla ([Shpigel et al., 2004; Ciaravolo et al. 2014]).

Il cibo sembra giocare un ruolo molto importante nella regolazione del ciclo riproduttivo. È comprovato che l'Indice Gonadosomatico è fortemente correlato alla quantità e alla qualità del cibo (Spirlet et al., 1998); diete miste (con componenti animali e vegetale) sembrano, inoltre, coprire tutte le esigenze alimentari di *P. lividus* (Lawrence et al., 1992; Fabbrocini & D'Adamo, 2010; Fabbrocini et al., 2011; Cirino et al., 2011).

Il fotoperiodo ha meno influenza rispetto alla temperatura sul ciclo riproduttivo e sulla crescita gonadica di *P. lividus* (Spirlet et al., 2000), soprattutto in condizioni di coltura (Spirlet et al., 1998).

Pertanto, lo sviluppo di tecniche di allevamento e di mantenimento a lungo termine di questa specie potrebbe rappresentare una soluzione per la disponibilità continua di gameti, promuovendo ulteriormente l'utilizzo di riccio di mare come modello animale per la ricerca scientifica.

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'efficacia di diversi protocolli di stabulazione per il mantenimento a lungo termine di individui di *P. lividus* con gonadi mature ed in grado di garantire una disponibilità continua di gameti, che sono stati utilizzati in test di embriotossicità e spermotossicità, allo scopo di validarne l'impiego in studi di ecotossicologia.

## ***Materiali e metodi***

### **Animali e Protocolli di stabulazione**

In questa fase preliminare sono stati saggiati esemplari di *P. lividus* mantenuti in circuito semi-chiuso con diversi protocolli di stabulazione (Tabella 1). In particolare, abbiamo applicato due protocolli variati in base alla temperatura e dieta.

**Protocollo 1** (TR/SF) : temperatura controllata,  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  (TR); cibo formulato (SF)

**Protocollo 2** (TA/Mix) : temperatura stagionale, variabile tra  $15$  e  $27^\circ\text{C}$  (TA); dieta naturale alternata (Mix)

Il cibo formulato, utilizzato nel protocollo 1, è stato elaborato per ottimizzare la gestione dei ricci in mantenimento e finalizzato ad ottenere una rapida crescita gonadica. Questo alimento contiene componenti naturali sia di origine animale che vegetale ed è prodotto come cibo "pronto all'uso".

Nella dieta naturale, utilizzata nel protocollo 2, diversi alimenti (alghe e mais) sono stati somministrati *ad libitum*, alternandoli.

Gli animali da testare sono stati raggruppati in base alla durata della stabulazione in 2 macro- categorie; la prima (M) comprendente animali stabulati da breve (20 giorni) a lungo termine (24 mesi), la seconda (W) con animali appena campionati o stabulati al massimo per 7 giorni.

## Embriotossicità

I gameti sono stati ottenuti dagli organismi in seguito ad emissione indotta con metodi non invasivi.

I test di embriotossicità sono stati eseguiti secondo il protocollo di S. Manzo et al., 2005.

Per il test di embriotossicità è stata eseguita la fecondazione aggiungendo 1mL di sperma, diluito 1:1000 in ASTM, ad una sospensione di uova e incubando a  $18\pm 1$  °C per 20 min. Dopo circa 20 min è stato quindi verificato il successo della fecondazione valutando la presenza della membrana di fecondazione su un campione di 100 uova.

Le uova sono state così incubate a  $18\pm 1$  °C per 48-50 h. Trascorso questo periodo, i plutei sono stati fissati con formalina e, per ogni replica, sono state verificate, mediante osservazione al microscopio ottico, eventuali anomalie nello sviluppo larvale di 100 individui.

I plutei sono stati dunque classificati in quattro classi: larve normali (N), larve malformate aventi difetti a livello dello scheletro e/o dell' intestino (P1), embrioni con arresto pre-larvale e quindi incapaci di effettuare un differenziamento larvale (P2), larve ritardate cioè con morfologia simile ai normali ma con dimensioni ridotte (R).

Tabella 1 Tipologia, caratteristiche e protocolli di stabulazione per gli organismi utilizzati nella sperimentazione

Tipologia	Caratteristiche degli animali			Protocollo di stabulazione
	Ø (mm)	Peso(g)	GI	
M1	52,5	57,2	10,7	12-24 mesi TR/SF
M2	52	63	4,5	9-12mesi TR/SF
M3	50	53	9,2	10-12mesi TR/SF
M4	48	48,7	7,2	4-12mesi TR/SF
M5(27/11/13)	40	33,2	1,3	7-8mesi TA/Mix
M6 (4/6/2014)	45	45,3	2,6	3mesi→TA/Mix 1mese→ TR/SF
M7 (20/5/2014)	42,6	40,5	2,4	20 gg→TA/Mix 30gg→TR/SF
M8 (24/9/2014)	48,7	57,2	4,1	20 giorniTA/Mix
W1 (10/6/2014)	43,2	41,8	4,6	7 giorniTA/Mix
W2 (13/10/2014)	46	46,4	1,6	1 giornoTA/Mix
W3 (20/10/2014)	43,8	40,5	2	1 giornoTA/Mix
W4(29/10/2014)	42,5	32,2	4,5	Non stabulati

## *Risultati e Discussione*

Nella Figura 1 sono riportati i grafici relativi ai tassi di fecondazione e la % di plutei normali ottenuti per ogni categoria di organismi.

La fecondazione non sembrerebbe essere un parametro dipendente dalla stagionalità del prelievo degli organismi, dalle loro caratteristiche e dalla località di provenienza ed il protocollo di stabulazione non ne modifica l'efficienza in modo significativo (Tab. 1 e Fig.1). Il corretto sviluppo embrionale fino allo stadio di pluteo (48-50h), è dipendente dall' azione simultanea di alcune variabili considerate come condizioni degli organismi, temperatura al momento del prelievo, tempo e protocollo di stabulazione. Una lunga stabulazione a temperatura controllata (M1) permette di ottenere una discreta qualità dei gameti, ma non ne consente un utilizzo ottimale in ecotossicologia.

Considerando tutti gli organismi con stabulazione maggiore ad una settimana (M1-M8), si nota una maggiore frequenza di plutei normali per gli individui M6 (Fig. 2) prelevati in condizioni di temperatura ottimale (18°C) sebbene in giugno, stabulati per 3 mesi in regime di temperatura stagionale e dieta naturale, ed 1 mese a temperatura controllata e dieta con cibo formulato. Dal grafico relativo (Fig. 1) si evince che la percentuale più alta si ottiene dopo circa due settimane dal cambio di protocollo di stabulazione, a fine settembre, coincidente con l'inizio dell'autunno e della stagione riproduttiva usuale.

In realtà le elevate temperature delle acque del golfo di Napoli dell' autunno 2014 (22-24°C) (Fig. 3) non hanno consentito tale ripresa negli organismi wild (W1-W4). Tra gli organismi con stabulazione minore di una settimana (W1-W4), si ottengono le percentuali di plutei normali più elevate con la categoria W1 (Fig. 2) prelevati e brevemente stabulati ad una temperatura compatibile con un periodo riproduttivo non ottimale (21°C) questo indipendentemente dalla stagione di prelievo.

Inusuali temperature stagionali, come quelle riscontrate nel periodo considerato, possono modificare il ciclo riproduttivo di questi echinodermi, alterandone il periodo di maturità, la disponibilità/reperibilità dei gameti, la loro qualità e, di conseguenza, il corretto sviluppo embrionale.

In tale direzione, la stabulazione potrebbe ristabilire le condizioni per ottenere che i due processi si riallineino ai fini della sperimentazione ecotossicologica.

Nel presente studio, il protocollo di stabulazione alternato TR/SF, TA/Mix sembrerebbe essere maggiormente efficace per la produzione di gameti validi per la ricerca. Probabilmente una estensione di tale protocollo su scala annuale, allineato con l'originaria stagionalità riproduttiva, potrebbe incrementarne ulteriormente la qualità.

Infine, le correlazioni tra l'efficienza dei gameti, i dati biometrici (diametro e peso totale), lo stato gonadico (Indice gonadosomatico, GI) ed tempi di stabulazione ed i protocolli di mantenimento, potrebbero portare ad individuare i fattori che maggiormente vanno ad influenzare la loro qualità nell'uso per saggi biologici.

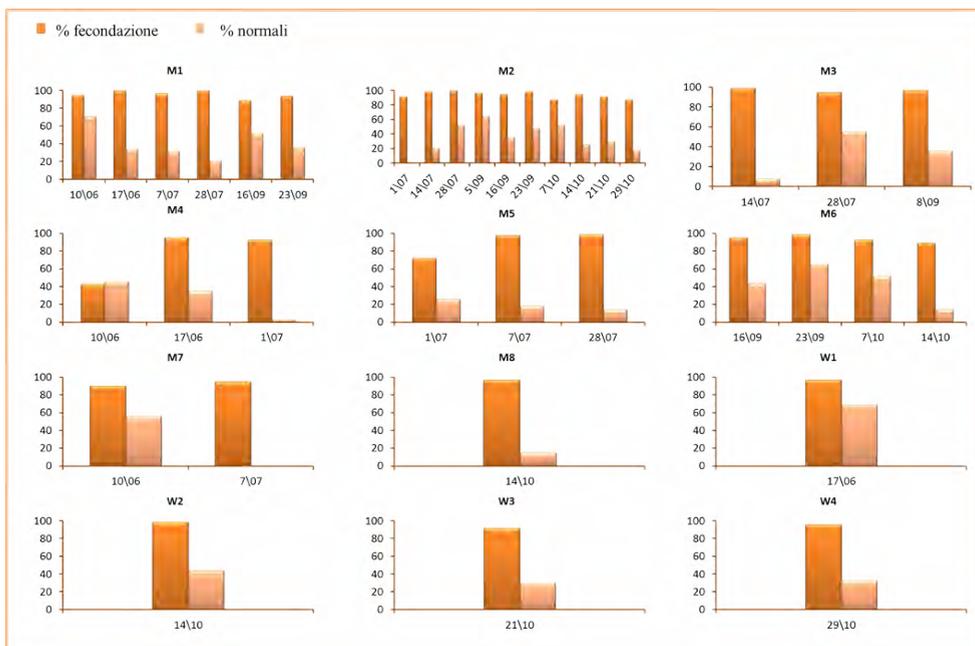


Figura 1. Percentuale di fecondazione e di plutei normali sviluppati per singola categoria

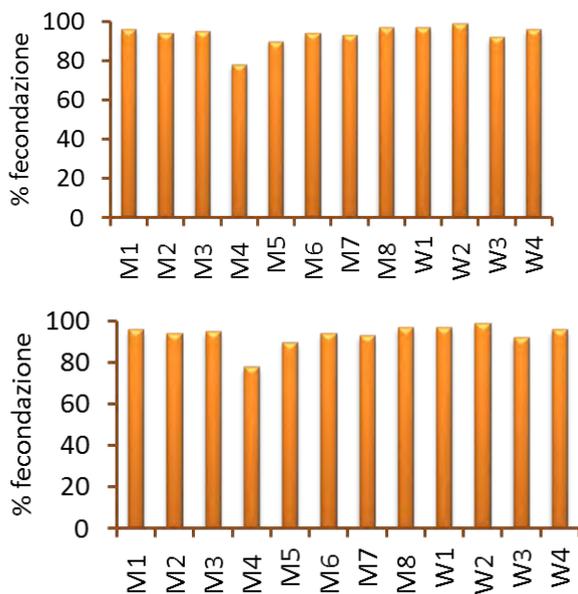


Fig. 2 Confronto tra le percentuali di fecondazione e di plutei normali di individui stabulati e individui wild.

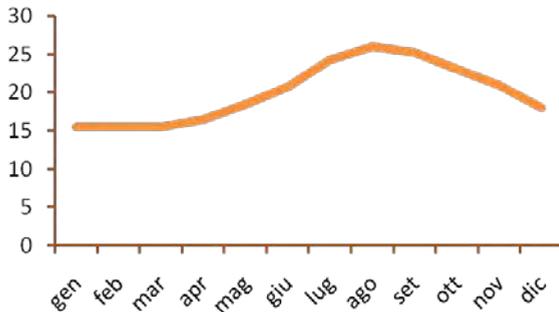


Fig. 3 Andamento della temperatura delle acque del Golfo di Napoli per gli anni 2013-2014

### ***Bibliografia***

- Bougis P 1959. Sur l'effet biologique du cuivre en eau de mer. CR Acad Sci Paris 249 (12): 326-328.
- Ciaravolo M., Di Cosmo A., Polese G., Cirino P., (2014). The marketing of *Paracentrotus lividus* gonadal growth versus maturation. Aquaculture Europe 2014 (AE 2014: Adding Value) Abstracts: 257.
- Cirino P., Ciaravolo M., Paglialonga A, Toscano A., (2011) A long term maintenance system for promoting out-of-season maturation in sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). Aquaculture Europe 2011 (AE 2011: Mediterranean Aquaculture 2020) Abstracts: 195.
- Dinnel P A, Stober Q J, DiJulio D H 1981. Sea urchin sperm bioassay for sewage and chlorinated sea water and its relation to fish bioassay. Mar Environ Res 5: 29-39.
- Fabbrocini A, D'Adamo R 2010. Gamete maturation and gonad growth in fed and starved sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). J Shellfish Res 29, No. 4: 1051-1059.
- Fabbrocini A, Volpe M G, Di Stasio M, D'Adamo R, Maurizio D, Coccia E, Paolucci M 2012. Agar-based pellet as feed for sea urchins (*Paracentrotus lividus*): rheological behaviour, digestive enzymes and gonad growth. Aquac Res 43: 321–331.
- Hagström B E, Lönning S 1973. The sea urchin egg as a testing object in toxicology. Acta Pharmacol Tox 32 (Supplement): 1-49.
- Kobayashi N 1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. Publ Seto Mar Biol Lab 18: pp. 379-406.
- Kobayashi N, Nogami H, Doi K 1972. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Inland Sea of Japan (the Seto-Naikai). Publ Seto Mar Biol Lab XIX (6): 359-381.
- Kobayashi N 1974. Marine pollution bioassay by sea urchin eggs, an attempt to enhance accuracy. Publ Seto Mar Biol Lab XXI (5/6): 377-391.
- Manzo S, Buono S, Creminini C 2006. Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. Arch Environ Contam Toxicol 51: 61-68.

- Pagano G, Cipollaro M, Corsale G, Esposito A, Ragucci E, Giordano GG, Trieff NM 1986. The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In: Cairns J Jr [ed] Community toxicity testing. Philadelphia: ASTM STP-920, American Society for Testing and Materials: 66-92.
- Shpigel M, MacBride S C, Marciano S, Lupatsch I 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 232: 343-355.
- Spirlet C, Grosjean P, Jangoux M 1998. Closed-circuit cultivation of the edible sea-urchin *Paracentrotus lividus*: optimization and control of gonadal growth. In: Mooi, R., Telford, M. (Eds.), *Echinoderms*: San Francisco. Balkema, Rotterdam, p. 835.
- Spirlet C, Grosjean P, Jangoux M 2000. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) [Echinodermata]. *Aquaculture* 185: 85-99.
- Wilson D P 1951. A biological difference between natural waters. *J Mar Biol Assoc UK* 30: 1-21.

# ESEMPIO DI ANALISI DI RISCHIO AMBIENTALE APPLICATA AI METALLI: AREA MARINA DEL GOLFO DELLA SPEZIA

di C. Milillo

Libera professionista – c.milillo@libero.it

---

**Abstract** - L'analisi di rischio ambientale consiste in una valutazione degli effetti dannosi che le sostanze chimiche possono determinare sulle popolazioni animali e vegetali. Scopo di questo lavoro è di eseguire un esempio di valutazione di rischio ambientale applicata al comparto acquatico relativamente alle concentrazioni di alcuni metalli misurate sperimentalmente nel Golfo della Spezia prima e durante le operazioni di dragaggio del sito di bonifica di interesse nazionale di Pitelli. Sono stati utilizzati i risultati del monitoraggio eseguito da ISPRA, ARPA Liguria, ISS e ASL 5 Spezzina prima e durante le attività di scavo relativamente alle concentrazioni di mercurio e piombo, nella matrice acqua in tre punti di campionamento. I risultati dimostrano che il rischio appare controllato per il piombo in tutti i campioni sia prima che durante gli scavi, mentre per il mercurio c'è un lieve rischio ambientale vicino all'area di scavo. Le concentrazioni dei due metalli sono in generale maggiori durante il dragaggio che nei controlli, ma si mantengono comunque a livelli molto bassi, come è confermato anche dalle analisi eseguite sul comparto biotico.

**Keywords:** Analisi di rischio, REACH, mercurio, piombo

## *Introduzione*

L'analisi del rischio ambientale comporta l'esame delle modalità di distribuzione delle sostanze e dei loro prodotti di degradazione e/o metaboliti nei diversi comparti ambientali nonché una valutazione degli effetti dannosi che tali prodotti possono determinare sulle popolazioni animali e vegetali con la finalità di consentire l'identificazione dei pericoli ambientali, l'adozione di strategie di controllo e riduzione dei rischi (<http://www.minambiente.it/pagina/la-valutazione-del-rischio-ambientale-dei-prodotti-chimici>).

La principale normativa comunitaria che prevede lo svolgimento di attività di valutazione di rischio ambientale è il Regolamento n. 1907/2006 (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH); per l'attuazione di questo Regolamento sono state pubblicate dall'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA) numerose Guide Tecniche in cui sono descritte le procedure da adottare per lo svolgimento di tutte le attività richieste, fra cui anche l'analisi di rischio ambientale.

Scopo di questo lavoro è di eseguire un esempio di valutazione di rischio ambientale applicata al comparto acquatico relativamente alle concentrazioni di alcuni metalli (mercurio e piombo) misurate sperimentalmente nel Golfo della Spezia prima e durante le operazioni di dragaggio del sito di bonifica di interesse nazionale di Pitelli.

## ***Materiali e metodi***

L'analisi del rischio ambientale, eseguita secondo le Guide Tecniche di applicazione del Regolamento REACH, procede secondo quattro fasi:

- Identificazione del pericolo: individuazione di proprietà dannose per gli ecosistemi delle sostanze in esame;
- Caratterizzazione del pericolo (Hazard Assessment - HA): determinazione delle concentrazioni prevedibili senza effetto per il comparto ambientale considerato (PNEC);
- Stima dell'esposizione (Exposure Assessment - EA): calcolo delle prevedibili concentrazioni nel comparto ambientale considerato, a partire dai dati delle emissioni o delle quantità utilizzate nelle attività produttive;
- Caratterizzazione del rischio (Risk Characterisation - RC): calcolo del rapporto tra concentrazioni ambientali e concentrazioni di non effetto; questa fase consente di stabilire se il livello di rischio stimato rientra o meno entro valori considerati accettabili (ECHA, 2008b).

Il sito di bonifica di interesse nazionale di Pitelli include nella perimetrazione (DM 10/01/00 e DM 27/02/01) l'intera area marina della Rada della Spezia fino alla diga foranea.

I risultati della caratterizzazione dell'area marina eseguiti nel 2004 hanno evidenziato una contaminazione dei sedimenti del Golfo dovuta a metalli pesanti, idrocarburi, TBT e IPA (ICRAM, 2005).

Per accertare i possibili effetti ambientali del dragaggio dei fondali eseguito da novembre 2007 a dicembre 2013 in attuazione delle attività di bonifica, l'Autorità Portuale della Spezia, con il supporto di ICRAM (oggi ISPRA), ARPA Liguria, ISS e ASL 5 Spezzina, ha eseguito un monitoraggio sulla matrice acqua, con controlli sui comparti biotico ed abiotico, prima dell'avvio delle attività di movimentazione dei sedimenti (dal 2006 a luglio 2007) e durante le stesse (ISPRA, 2010).

Nel presente lavoro sono stati utilizzati i risultati del monitoraggio relativamente alle concentrazioni di due metalli, il mercurio e il piombo, nella matrice acqua in punti di campionamento situati presso l'area di dragaggio (PO030), al centro del golfo (PO117) e presso l'impianto di mitilicoltura (PO199) (Fig. 1).



*Figura 1: punti di campionamento*

## **Risultati**

### *Identificazione del pericolo*

Nelle acque superficiali il mercurio può esistere nella forma mercurica ( $Hg^{+2}$ ) e mercuriosa ( $Hg^{+1}$ ); i composti mercuriosi in mare si trasformano rapidamente in ioni mercurici (U.S. Department of health and human services, 1999); la flora microbica trasforma il mercurio metallico, i suoi ioni e metaboliti in metilmercurio, molto tossico;

negli organismi acquatici il 90-99% del mercurio è presente come metilmercurio (<http://www.iss.it/binary/publ/cont/9916ll.pdf>); il mercurio elementare è quasi insolubile in acqua, la solubilità dei composti inorganici è variabile, mentre i composti organici sono quasi tutti solubili (INERIS, 2010).

Per quanto riguarda la pericolosità per l'ambiente, il Regolamento CE n. 1272 del 16 dicembre 2008 (cosiddetto Regolamento CLP) relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele, riporta per il mercurio: "Pericoloso per l'ambiente acquatico - pericolo acuto, categoria 1" e "Pericoloso per l'ambiente acquatico - pericolo cronico, categoria 1", a cui corrispondono le Indicazioni di pericolo "H400 altamente tossico per gli organismi acquatici" e "H410 molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata".

Il piombo esiste sotto gli stati di ossidazione 0, +II, +IV; nell'ambiente è raramente nello stato elementare, ma principalmente nello stato +II; la maggior parte dei composti inorganici del piombo (II) sono poco solubili in acqua e nel mezzo

acquatico; il piombo tende a essere eliminato dalla colonna d'acqua per adsorbimento sulla materia organica e sui sali di argilla dei sedimenti (INERIS, 2003).

Per il piombo non c'è una classificazione armonizzata ai sensi del Regolamento CLP, ma la maggior parte delle notifiche effettuate ai sensi del suddetto regolamento riportano la stessa classificazione del mercurio.

#### *Caratterizzazione del pericolo*

Le concentrazioni prevedibili senza effetto (PNEC) sono le concentrazioni di una sostanza chimica nel compartimento ambientale di interesse al di sotto delle quali è probabile che non si verifichino effetti dannosi per l'ecosistema e i suoi organismi durante l'esposizione a lungo o a breve termine.

Si possono calcolare col metodo dell'estrapolazione statistica o dei fattori di valutazione: il primo calcola la concentrazione che si assume sia protettiva di una certa percentuale (es. 95%) di specie dell'ecosistema verso gli effetti tossici, e si basa sulla distribuzione statistica dei dati di tossicità per gli organismi acquatici; nel secondo, si divide il più basso valore di tossicità risultante dai dati di laboratorio per un pertinente fattore di valutazione (Assessment Factor, AF) (ECHA, 2008b). Si è scelto di utilizzare i valori di PNEC indicati dall'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) francese, che per il comparto acquatico propone 0,24 µg/l per il mercurio inorganico, 0,01 µg/l per il mercurio organico e di 5,4 µg/l per il piombo, tutti calcolati col metodo dell'estrapolazione statistica (INERIS, 2003; INERIS, 2010).

#### *Stima dell'esposizione*

In questo caso non si sono calcolate le concentrazioni ambientali previste partendo dai dati delle emissioni, ma si sono considerate direttamente quelle rilevate sperimentalmente nelle campagne di monitoraggio (ARPAL, 2003-2013).

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportati i 90° percentili (per considerare la situazione peggiore verificatesi) delle concentrazioni totali in µg/l rispettivamente di mercurio e piombo nei punti di campionamento considerati, prima e durante le attività di dragaggio, alle profondità di 0,5 m sotto la superficie e di 0,5 m sopra il fondale.

**Tab. 1: 90° percentile concentrazioni di Hg totale (µg/l)**

		<b>controllo</b>	<b>dragaggio</b>
P0030	superficial	0,01718	0,01325
	profondo	0,0042	0,013
P0199	superficial	0,0016	0,0077
	profondo	0,00736	0,00985
P0117	superficial	0,00242	0,0089
	profondo	0,00348	0,01

**Tab. 2: 90° percentile concentrazioni di Pb totale (µg/l)**

		controllo	dragaggio
P0030	superficial	0,3636	1,0604
	profondo	0,3966	0,8265
P0199	superficial	0,03275	1,142
	profondo	1,21625	0,5338
P0117	superficial	0,338	0,8684
	profondo	0,2028	0,76

Nel caso dei metalli, la concentrazione disciolta, e quindi biodisponibile, varia in funzione delle caratteristiche fisico- chimiche dell'ambiente; se non si hanno a disposizione appropriati modelli di speciazione e informazioni sulle caratteristiche dell'ambiente in esame, si può convertire la concentrazione totale in concentrazione disciolta tramite la formula (ECHA, 2008a):

$$C_{dissolved} = \frac{C_{total}}{(1 + K_d \times C_s \times 10^{-6})}$$

Dove  $C_{dissolved}$  è la concentrazione disciolta in mg/l  $C_{total}$  è la concentrazione totale in mg/l

$K_d$  è il coefficiente di distribuzione solidi sospesi/acqua, in l/kg, definito come il rapporto fra la concentrazione del metallo adsorbito ai solidi sospesi e la concentrazione del metallo disciolto

$C_s$  è la concentrazione dei solidi sospesi in mg/l

Utilizzando il 10° percentile delle concentrazioni di solidi sospesi nei campioni in esame (per avere un approccio

conservativo e massimizzare la concentrazione disciolta) e i valori di  $K_d$  riportati dall'U.S. EPA nel 2005 ( $\log K_{d-Hg} = 5,3$  l/kg;  $\log K_{d-Pb} = 5,6$  l/kg, corrispondenti alla mediana di più di 200 dati riportati in letteratura), le concentrazioni nei campioni in esame diventano le seguenti:

**Tab. 3: 90° percentile concentrazioni di Hg disciolto (µg/l)**

		controllo	dragaggio
P0030	superficiale	0,0119	0,00603
	profondo	0,0035	0,00723
P0199	superficiale	0,00049	0,00335
	profondo	0,00219	0,00469
P0117	superficiale	0,00202	0,00297
	profondo	0,00155	0,00334

**Tab. 4: 90° percentile concentrazioni di Pb disciolto ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )**

		<b>controllo</b>	<b>dragaggio</b>
P0030	superficiale	0,194	0,313
	profondo	0,284	0,319
P0199	superficiale	0,00604	0,318
	profondo	0,213	0,191
P0117	superficiale	0,242	0,174
	profondo	0,0585	0,152

#### *Caratterizzazione del rischio*

Rappresenta la fase finale dell'analisi di rischio. Indica se i rischi derivanti dalla presenza di una sostanza nell'ambiente sono opportunamente controllati e consiste in un confronto dei PNEC con le concentrazioni rilevate nell'ambiente (ECHA, 2008c). Il rischio risulta controllato se le concentrazioni ambientali sono minori dei PNEC.

Per la caratterizzazione del rischio comunque, sia le concentrazioni ambientali che i PNEC dovrebbero essere espressi allo stesso livello di biodisponibilità: siccome non sono direttamente disponibili i dati sperimentali utilizzati per il calcolo dei PNEC, dunque non si sa se sono state utilizzate le concentrazioni di metallo totale o disciolto, per la caratterizzazione del rischio si dovrebbero utilizzare i dati delle tabelle 1 e 2; per il piombo comunque tutti i valori sono minori del PNEC, usando sia le concentrazioni totali che quelle disciolte; per il mercurio, utilizzando il PNEC minore per essere più conservativi, risultano leggermente maggiori di 0,01  $\mu\text{g}/\text{l}$  i campioni vicino al sito di dragaggio in superficie sia prima che durante gli scavi, e in profondità durante gli scavi, usando le concentrazioni totali; usando le concentrazioni disciolte, rimane maggiore solo il campione superficiale prelevato nello stesso sito prima degli scavi.

#### *Discussione e conclusioni*

Come evidenziato dai risultati, il rischio appare controllato per il piombo in tutti i campioni sia prima che durante gli scavi, mentre per il mercurio c'è un lieve rischio ambientale vicino all'area di scavo. Le concentrazioni dei due metalli sono in generale maggiori durante il dragaggio che nei controlli, ma si mantengono comunque a livelli molto bassi.

Questo è confermato anche dalle analisi eseguite sul comparto biotico (concentrazioni nei mitili e nei pesci) dal

2003 al 2010 e poi interrotte in quanto si sono potuti escludere effetti delle attività di dragaggio sugli organismi considerati: infatti le concentrazioni dei metalli sono risultate confrontabili nei campioni raccolti prima e durante gli scavi e comunque minori ai limiti di legge (Regolamento CE 1881/2006), tranne che per il piombo in campioni raccolti di fronte ad uno stabilimento in passato adibito alla lavorazione di questo metallo (ISPRA, 2010).

Per approfondire l'analisi nel sito più vicino all'area di dragaggio, bisognerebbe usare modelli di speciazione fisico- chimica dei metalli, che tengano in considerazione le caratteristiche ambientali dei siti in esame, o software come il Biotic Ligand Model, sviluppato per valutare come la composizione chimica

dell'acqua influenzi la speciazione e la biodisponibilità dei metalli (ECHA, 2008a): la versione attualmente disponibile di quest'ultimo però, non è utilizzabile per i metalli in esame, ma solo per il rame, l'argento, il cadmio e lo zinco (Biotic Ligand Model, 2007).

### ***Bibliografia***

ARPAL 1°-10° Relazione attività di monitoraggio del Golfo della Spezia per il dragaggio dello specchio acqueo antistante Terminal Ravano e Molo Fornelli e Bacino Evoluzione (2003-2013).

Biotic Ligand Model Windows Interface, Version 2.2.3: User's Guide and Reference Manual, HydroQual, Inc, Mahwah, NJ, June 2007.

ECHA (2008a). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. [Appendix R.7.13-2: Environmental risk assessment for metals and metal compounds]. ECHA, Helsinki, Finland.

ECHA (2008b). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. [Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment]. ECHA, Helsinki, Finland.

ECHA (2008c). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. [Part E: Risk Characterisation], ECHA, Helsinki, Finland.

ICRAM "Progetto preliminare di bonifica dell'area marina inclusa nella perimetrazione del sito di bonifica di interesse nazionale di Pitelli", 2005

INERIS, "Mercure et ses dérivés", 2010 INERIS, "Plomb et ses dérivés", 2003.

ISPRA 2010 "Attività di monitoraggio per la bonifica dei fondali antistanti il Terminal Ravano nel Porto della Spezia" - Relazione Tecnica

REGOLAMENTO (CE) n. 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE

REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.

REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

U.S. Department of health and human services "Toxicological profile for Mercury", 1999.

U.S. EPA (2005) Partition Coefficients for Metals in Surface Water, Soil and Waste, EPA/600/R-05/074.

# PROGETTO GAMBERO DI ACQUA DOLCE: ESEMPIO DI APPLICAZIONE DI BATTERIE DI SAGGI ECOTOSSICOLOGICI

by F. Lazzeri<sup>a</sup>, M. Casera<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio biologico provinciale APPA Bolzano - francesca.lazzeri@provincia.bz.it

<sup>a</sup> Laboratorio biologico provinciale APPA Bolzano - maddalena.casera@provincia.bz.it

---

**Abstract** - Il “Progetto di tutela del gambero di acqua dolce *Austropotamobius pallipes italicus*”, iniziato nel 2006 per valutare le possibili cause della scomparsa del gambero di fiume dal Rio Gambero, in Provincia di Bolzano, nel 2014 è stato esteso ad altri 4 corpi idrici situati sul territorio provinciale per avere ulteriori dati di confronto. In particolare sono state svolte analisi ecotossicologiche multispecie su campioni di sedimento e di acqua superficiale prelevati sul Rio Krebs e sul Rio Hyppolith, situati in zona montana ed entrambi con popolazioni di gamberi ancora intatte, sulla Fossa Buozi situata a valle della zona industriale di Bolzano, nella quale solo recentemente (2013) è stata rilevata la presenza di una popolazione molto numerosa di questi crostacei, e l'adiacente fossa Mühlgraben, nella quale i gamberi risultano totalmente assenti. Parallelamente il Laboratorio analisi acque e cromatografia ha eseguito le analisi dei metalli pesanti e dei pesticidi sia sui sedimenti che sull'acqua superficiale. Il sedimento è infatti il comparto in cui convergono i processi di concentrazione degli inquinanti organici ed inorganici.

Dalle analisi ecotossicologiche e chimiche svolte emerge la presenza di una tossicità leggermente superiore e di una maggiore concentrazione di metalli pesanti nei sedimenti delle due fosse situate a valle di Bolzano. La differente consistenza della popolazione di gamberi in questi corsi d'acqua non sembra essere comunque dovuta alla eventuale tossicità dei sedimenti, ma piuttosto alla struttura dell'habitat e all'intensità dell'attività agricola del territorio circostante. La presenza dei gamberi di acqua dolce è infatti legata ad un ambiente strutturalmente variegato, fonte di nutrimento e di riparo.

Keywords: ecotossicologia, sedimenti, batteria di test ecotossicologici, analisi chimiche

## Introduzione

Il gambero di fiume (*Austropotamobius pallipes italicus*), 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. 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. Alla fine del 2006, per comprendere le possibili cause della scomparsa del

gambero di fiume, sono state inserite le analisi ecotossicologiche multispecie su alcuni campioni di sedimento e acqua superficiale prelevati dal **Rio Gambero**, un tempo particolarmente ricco di questi crostacei. Tale iniziativa nel 2014 è stata estesa ad altri 4 corpi idrici situati sul territorio provinciale per avere ulteriori dati di confronto. In particolare sono state svolte analisi ecotossicologiche multispecie su campioni di sedimento e di acqua superficiale prelevati sul Rio Krebs e sul Rio Hyppolith, situati in zona montana ed entrambi con popolazioni di gamberi ancora intatte, sulla Fossa Buozi situata a valle della zona industriale di Bolzano, nella quale solo recentemente (2013) è stata rilevata la presenza di una popolazione molto numerosa di questi crostacei, e l'adiacente fossa Mühlggraben, nella quale i gamberi risultano totalmente assenti. Parallelamente il Laboratorio analisi acque e cromatografia ha eseguito le analisi dei metalli pesanti e dei pesticidi sia sui sedimenti che sull'acqua superficiale. 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. È opportuno infatti l'utilizzo di organismi test appartenenti a 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), il test acuto con il cladocero *Daphnia magna* e il test algale con *Pseudokirchneriella subcapitata*.

### **Materiali e metodi**

Il prelievo di acqua superficiale e sedimento è stato eseguito su 4 corsi d'acqua:

- 1) **Rio Krebs**, sito in zona montana con una stima di popolazione di gamberi di ca. 1000 individui.
- 2) **Rio Hyppolith**, sito in zona montana con una stima di popolazione di gamberi di ca. 1000 individui.
- 3) **Fossa Buozi**, sita a sud della zona industriale di Bolzano con una stima di popolazione di gamberi di ca. 2.000 individui.
- 4) **Fossa Mühlggraben**, sita a sud della zona industriale di Bolzano con una stima di popolazione di gamberi di ca. 0 individui.

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 APAT IRSA CNR 8020/2003), il test di tossicità acuta con i batteri bioluminescenti della specie *Vibrio fischeri* (protocollo "Comparison test" per strumento Microtox), il test di tossicità algale con l'alga unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* (metodo UNI ENI 28692/2012) 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 tre test sono stati effettuati sui campioni di acqua superficiale ed elutriato, mentre il test di fitotossicità è stato condotto 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 APAT IRSA CNR 8020/2003 , mentre per il test con i batteri bioluminescenti algali e di fitotossicità da acqua ultrapura.

il Laboratorio analisi acque e cromatografia ha eseguito le analisi dei metalli pesanti e dei pesticidi sia sui sedimenti che sull'acqua superficiale seguendo le metodiche previste dalla normativa.

Per quanto riguarda l'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). Per il test algale è considerata la % di inibizione. 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).

### Risultati

Il test con *Daphnia magna* non ha rilevato alcuna tossicità. Le analisi con i batteri bioluminescenti della specie *Vibrio fischeri* hanno evidenziato un'inibizione della bioluminescenza superiore al 20% per gli elutriati della Fossa Buozzi e della Fossa Mühlgraben. Il test algale ha evidenziato una lieve inibizione della crescita algale solamente per i campioni di elutriato della Fossa Buozzi e del Rio Krebs.

Per quanto riguarda il test di fitotossicità, per verificare se le differenze tra il controllo ed i campioni di sedimento ed elutriato fossero significative, i dati di germinabilità media, di lunghezza della radice e del germoglio in mm di ciascun seme, sono stati saggiati mediante l'analisi della varianza (ANOVA univariata). Differenze molto significative sono state rilevate in tutti i campioni di sedimento per l'allungamento della radice del cetriolo e della radice e germoglio del sorgo. Il crescione ha invece evidenziato un'inibizione significativa della crescita radicale nel campione di elutriato della Fossa Mühlgraben.

Tabella 1. risultati test eco tossicologici

Punto di prelievo	Matrice	Daphnia magna	Vibrio fischeri	Test algale	Test di fitotossicità			
					allung. Radicale mm	allung. Radicale mm	allung. Radicale mm	allung. Germoglio mm
		% mortalità	% inibizione biolum.	% inibizione accrescim.				
					cetriolo	crescione	sorgo	
Fossa Buozzi	Acqua superficiale	0	-15.64	-2.84	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

	elutriato	0	34.53	12.88	75.65	58.38	37.4	37.35
	sedimento	n.r.	n.r.	n.r.	44.44	64.4	30.7	12.3
Fossa Mühlgraben	Acqua superficiale	0	-46.68	4.39	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
	elutriato	0	46.43	9.31	69.67	47.08	28.29	37.74
	sedimento	n.r.	n.r.	n.r.	44.72	71.13	26.16	12.85
Rio Hypolith	Acqua superficiale	0	-20.07	2.17	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
	elutriato	0	5.419	8.90	66.68	52.2	41.18	38.73
	sedimento	n.r.	n.r.	n.r.	50.72	69.88	29.27	11.68
Rio Krebs	Acqua superficiale	0	-15.75	2.80	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
	elutriato	0	-5.124	19.32	83.33	60.15	48.33	41.79
	sedimento	n.r.	n.r.	n.r.	55.43	61.58	28.73	22.57

■ Inibizione > 20% o differenza molto significativa,  $p < 0,01$  (ANOVA univariata)

■ Debole tossicità o differenza significativa,  $p < 0,05$  (ANOVA univariata)

### Risultati analisi chimiche

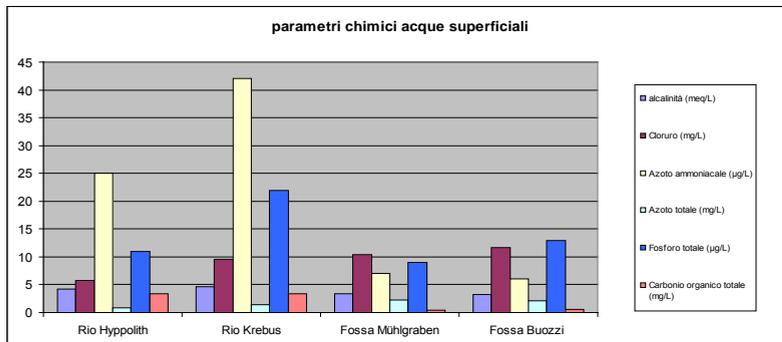


Grafico 1. Analisi chimica acque superficiali

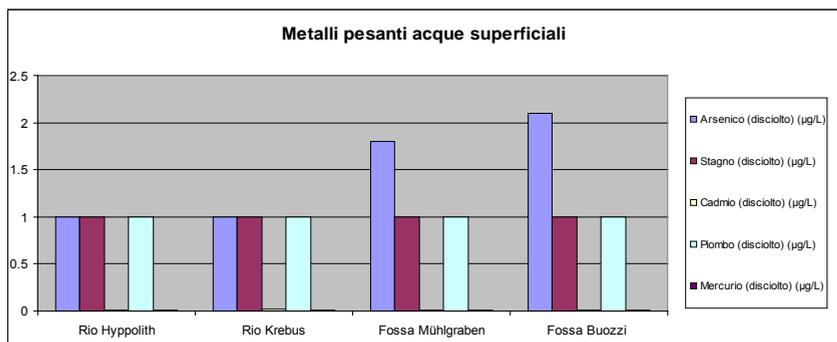


Grafico 2. Metalli pesanti in acque superficiali

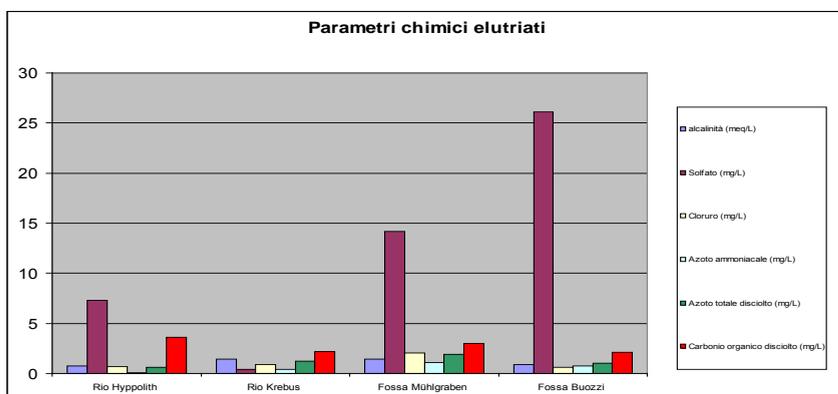


Grafico 3. Analisi chimica elutriati

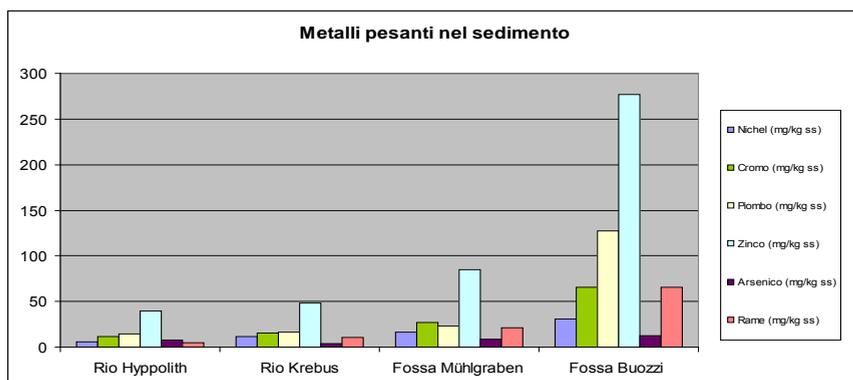


Grafico 4. metalli pesanti sedimento

Tabella 2. Concentrazione antiparassitari in acqua superficiale e sedimenti.

Concentrazione antiparassitari in totale	Acqua superficiale	sedimenti
Rio Hypolith	< 0.05 µg/L	< 0.01 mg/kg
Rio Krebsus	< 0.05 µg/L	< 0.01 mg/kg
Fossa Mühlgraben	< 0.05 µg/L	< 0.01 mg/kg
Fossa Buozzi	< 0.05 µg/L	< 0.01 mg/kg

Dalle analisi chimiche, è emerso che per quanto riguarda i metalli pesanti e gli antiparassitari, la loro concentrazione non è mai superiore ai valori normali riportati in bibliografia, sia per le acque superficiali che per i sedimenti (Merian, 1984 e Alloway, 1995) di tutti i campioni considerati. Emerge in generale una concentrazione maggiore di metalli pesanti nei sedimenti della Fossa Buozzi, rispetto alla Fossa Mühlgraben e soprattutto rispetto al Rio Hypolith e al Rio Krebsus. La concentrazione di azoto totale e cloruri risulta essere superiore nelle acque superficiali della Fossa Buozzi e della Fossa Mühlgraben, rispetto al Rio Hypolith e al Rio Krebsus. Il TOC risulta essere più elevato nell'acqua superficiale del Rio Hypolith e del Rio Krebsus.

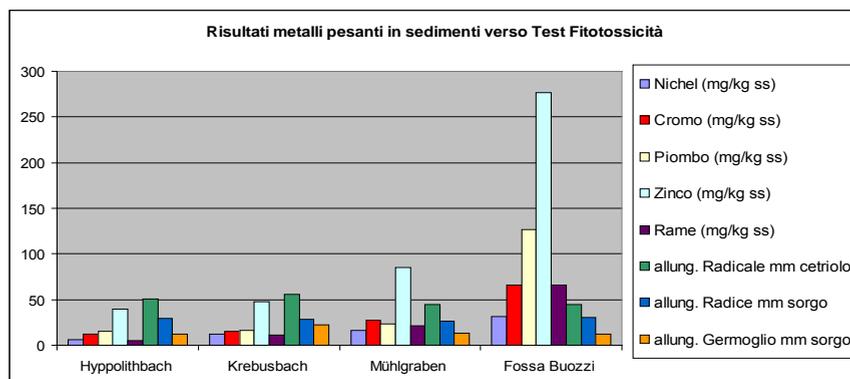


Grafico 5. Confronto concentrazione metalli pesanti nei sedimenti con risultati test ecotossicologici.

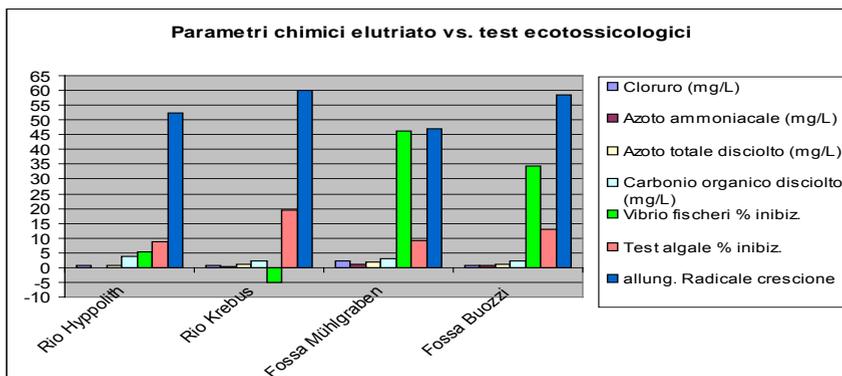


Grafico 6. Confronto parametri chimici negli elutriati con risultati test ecotossicologici.

Da un confronto tra analisi chimiche ed ecotossicologiche emerge in generale una maggiore inibizione dell'allungamento radicale in presenza di una più elevata concentrazione di metalli e di cloruri, in particolare nella Fossa Mühlgraben, sia nei sedimenti che negli elutriati, rispetto agli altri corpi idrici indagati.

### Discussione e conclusioni

Dalle analisi ecotossicologiche e chimiche svolte emerge la presenza di una tossicità leggermente superiore e di una maggiore concentrazione di metalli pesanti nei sedimenti delle due fosse situate a valle di Bolzano. La differente consistenza della popolazione di gamberi in questi corsi d'acqua non sembra essere comunque dovuta alla eventuale tossicità dei sedimenti, come dimostrato dalla ricca popolazione di gamberi nella Fossa Buozzi, ma piuttosto alla struttura dell'habitat e all'intensità dell'attività agricola del territorio circostante. In particolare nella Fossa Mühlgraben, che è un affluente della Fossa Buozzi, la totale mancanza di gamberi sembra sia dovuta all'assenza di un substrato diversificato. I gamberi di acqua dolce sono infatti buoni indicatori di un ambiente strutturalmente ricco (Pöckl et al., 1999). Per la sopravvivenza di una popolazione di gamberi sono fondamentali la presenza di detrito vegetale, muschi e periphyton, di radici e sassi di diversa granulometria, di una vegetazione e struttura ripariale intatta e variegata, sia come fonte di nutrimento che come possibile riparo (Gherardi et al., 2004).

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 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 infine come l'impiego di test ecotossicologici multispecie su matrici diverse (acqua e sedimento) possa essere utile nelle indagini interdisciplinari per la valutazione della qualità degli ambienti acquatici e come i sedimenti siano uno dei comparti più efficaci per il monitoraggio ambientale.

### ***Ringraziamenti***

Gli autori desiderano ringraziare i colleghi del Laboratorio analisi acque e cromatografia dell'APPA Bolzano per l'esecuzione delle analisi chimiche del presente studio.

### ***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, 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.
- 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.
- Füreder, L., Hanel, R. e Nössing, A. (2001). "Ökologische Aufnahmen an rezenten Krebsbeständen und Wiederansiedlung in früheren, ökologisch wertvollen Standorten". pp. 1-71
- Gherardi, F., Acquistapace, P. e Santini, G. (2004). "Food selection in omnivores a case study of the crayfish *Austropotamobius pallipes*". *Arch. Hydrobiol.* 159: 357-376
- 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.

Merian, (1984). Metallkonzentrationen in Böden und Pflanzen (ppm, bezogen auf di Trockenmasse), sowie von Oberflächengewässern (ppb, µg/Liter).

Metodo APAT CNR-IRSA 8020B Man. N. 29 (2003). Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia magna*.

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. Riripartizione Agenzia Provinciale per l'Ambiente. <http://www.provincia.bz.it/agenzia-aaambiente/progetti/progetto-gambero.asp>.

Pökl, M. (1999). "Distribution of Crayfish Species in Austria with Special Reference to Introduced Species." *Freshwater Crayfish* 12: 733-750

UNI EN ISO 8692 (2012). Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. 21 pp.

Youden W. J. and Steiner E. H., *Statistical Manual of A. O. A. C.*, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., 1975.

# VALUTAZIONE INTEGRATA DELLO STATO DI SALUTE DEGLI ECOSISTEMI DEL BACINO IDROGRAFICO DEL FIUME VOLTURNO

di S. Cacioli<sup>a</sup>, B. Gustavino<sup>b</sup>, C. Puccinelli<sup>c</sup>, S. Berasi<sup>d</sup>, S. Marcheggiani<sup>e</sup>,  
F. Chiudioni<sup>f</sup>, G. Damiani<sup>g</sup>, L. Mancini<sup>h</sup>.

<sup>a</sup>Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma - silvana.cacioli@iss.it

<sup>b</sup>Dipartimento di Biologia, Il Università degli Studi "Tor Vergata", Roma - gustavino@bio.uniroma2.it

<sup>c</sup>Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma - camilla.puccinelli@iss.it

<sup>d</sup>Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma - simona.berasi@iss.it

<sup>e</sup>Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma - stefania.marcheggiani@iss.it

<sup>f</sup>Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma - filippo.chiudioni@iss.it

<sup>g</sup>ARTA Abruzzo, Pescara - g.damiani@artaabruzzo.it

<sup>h</sup>Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma - laura.mancini@iss.it

---

**Abstract** - E' stata effettuata la valutazione dello stato di salute del Bacino idrografico del fiume Volturno integrando i dati ottenuti dalle analisi delle comunità macrobentoniche con quelli dei test ecotossicologici (*Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*), e genotossici (Test dei micronuclei-MN test). I tre set di indicatori utilizzati coprono intervalli diversi di informazioni e forniscono dati utili alla conoscenza dello stato ambientale dell'ecosistema in esame. I valori ottenuti dalla correlazione delle diverse componenti ambientali analizzate non mostrano linearità ma registrano situazioni ambientali compromesse a diversi livelli della catena trofica.

Keywords: Ecotossicità, mutagenesi, macrobenthos, approccio integrato.

## Introduzione

La salute degli ecosistemi acquatici può essere valutata attraverso un approccio integrato che permette di ottenere una visione globale attraverso l'analisi di componenti biotiche e abiotiche del corpo idrico [Ciadamidaro *et al.*, 2012]. In questo lavoro, è stata analizzata la comunità macrobentonica, determinate le principali caratteristiche chimico-fisiche ed eseguiti test di ecotossicità e mutagenesi, per valutare lo stato di salute del bacino idrografico del fiume Volturno [Mancini *et al.*, 2007]. I macroinvertebrati, sono uno degli indicatori biologici richiesti dalla Direttiva Quadro 2000/60/CE, per la valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua [Europa,2000].

Il test con *Vibrio fischeri* si basa sulla misura dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa da una popolazione monospecifica di batteri, in seguito ad esposizione a campioni che potrebbero contenere sostanze tossiche, mentre il test che utilizza la *Daphnia magna*, crostaceo d'acqua dolce, si basa sulla misura della

percentuale di mortalità/immobilità degli individui (Ciceri *et al.*, 2001). Il test dei micronuclei (Rizzoni *et al.*, 1995) è in grado di misurare gli effetti mutageni che risultano dall'interazione diretta o indiretta di agenti genotossici con il genoma delle cellule di organismi esposti. Il test è stato eseguito su un sistema vegetale (apici radicali di *Vicia faba*) dopo esposizione ai campioni di elutriato per valutare il potenziale mutageno dei possibili inquinanti in essi presenti.

### Materiali e metodi

Lo studio è stato effettuato selezionando un totale di nove stazioni di campionamento: cinque sull'asta fluviale del Calore, due sul Sabato e due sull'Isclero, in direzione da monte a valle. I tre corsi d'acqua scorrono all'interno della regione Campania, tra le provincie di Benevento e Avellino (Figura 1).

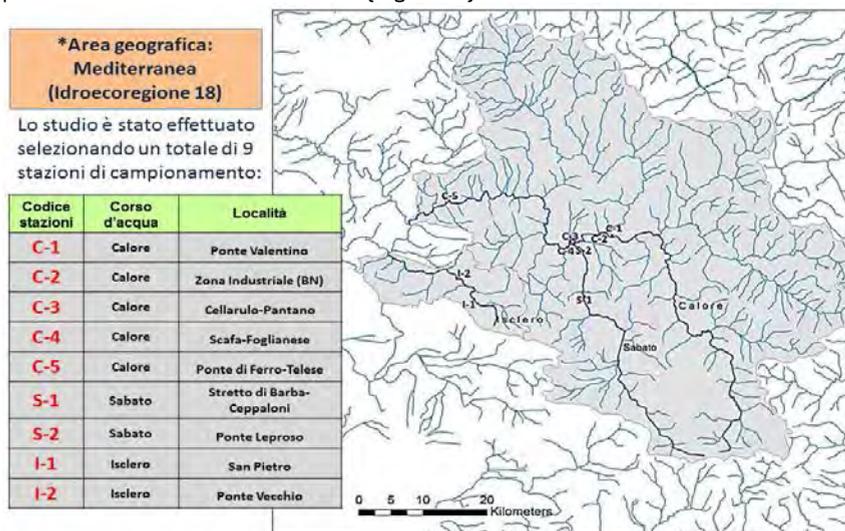


Figura 1. Reticolo idrografico dei corsi d'acqua in esame.

I parametri chimico-fisici (pH, Temperatura, Ossigeno disciolto) sono stati determinati attraverso l'utilizzo di una sonda multiparametrica.

Il campionamento dei sedimenti superficiali, effettuato nella stagione estiva, è stato praticato con una benna Heckman, strumento meccanico ampiamente utilizzato per questa tipologia di prelievi. E' stato scelto di lavorare su campioni di sedimento poiché ritenuti in grado di registrare maggiormente le variazioni ambientali, sia di origine naturale che antropica (Castelli *et al.*, 2003) al contrario dell'acqua che, scorrendo nel suo flusso naturale, risulta essere un indicatore meno accurato e più transitorio.

I campioni di sedimento sono stati trattati al fine di ottenere l'elutriato, preparato secondo la procedura EPA 503/8-91/001 (US-EPA, 1991) e utilizzato per tutte le tipologie di test eseguite.

Il campionamento e le analisi della comunità macrobentonica sono stati effettuati seguendo le norme standard italiane (ISPRA, 2007). Lo stato ecologico è stato determinato attraverso il calcolo dell'indice multimetrico STAR\_ICMi (Buffagni e Erba, 2007) con l'utilizzo del sistema MacrOper (Italia, 2010).

### Test di ecotossicità e mutagenesi

-Test di tossicità acuta su *Vibrio fischeri*. Il saggio si basa sull'inibizione della

luminescenza dei batteri. La quantità di luce emessa viene misurata attraverso lo strumento Microtox, collegato al software di gestione. I risultati sono espressi come inibizione % della luminescenza o come concentrazione efficace tale da indurre un'inibizione della bioluminescenza del batterio (UNI EN ISO 11348-2, 2007).

-Test di tossicità acuta su *Daphnia magna*: il saggio si basa sulla misura della percentuale di mortalità/immobilizzazione degli individui, dopo un'esposizione ai campioni per 24 e 48 ore (ISO 6341, 2012).

-Test di mutagenesi su *Vicia.faba* è considerato uno dei metodi più idonei per identificare la risposta integrata all'esposizione a miscele complesse di matrici ambientali contaminante perché rappresenta un indice del danno genetico accumulato nel tempo dall'organismo esposto. La comparsa dei micronuclei è legata sia alla perdita di frammenti cromosomici, sia alla perdita di interi cromosomi (Gustavino *et al.*, 2013). L'analisi microscopica delle frequenze dei micronuclei è stata eseguita in cellule proliferanti di apici radicali esposti alle matrici ambientali per 24 e 72 ore, esaminando 2.000 cellule per apice per un totale di 10 apici radicali per punto sperimentale.

### Risultati e Discussioni

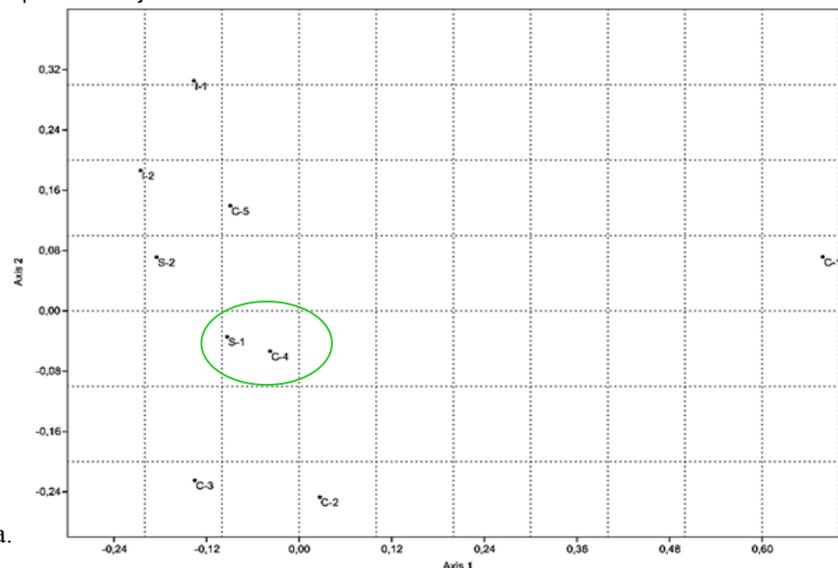
Per ogni stazione di campionamento è stato Calcolato l'indice STAR\_ICMi, da cui sono

	Axis 1	Axis 2	Star_ICMi
--	--------	--------	-----------

state ricavate le classi di Qualità dello Stato Ecologico, dalle quali risulta evidente come queste siano lontane dall'obiettivo di qualità buono. Solo per

un corso d'acqua lo stato ecologico varia da Buono a Scarso mentre per gli altri la classe di Qualità è prevalentemente di livello Scarso e in un caso Cattivo.

Dalle Analisi delle Corrispondenze e di correlazione, eseguite confrontando i dati di qualità ambientale ottenuti dallo studio della comunità macrobentonica con quelli ottenuti dai test ecotossicologici e di mutagenesi (Figura 2), è possibile affermare come non ci sia una evidente correlazione tra questi (0,31 correlazione di Spearman).



a.

<b>Axis 1</b>	-	0,552	0,776
<b>Axis 2</b>	0,217	-	0,312
<b>Star_ICMi</b>	- 0,1	- 0,383	-

b.

Figura 2 - a. Analisi delle corrispondenze tra i dati ottenuti dai test ecotossicologici e di mutagenesi e i valori degli indici di qualità ambientale dei macroinvertebrati (STAR\_ICMi); b. Tabella di correlazione (Correlazione di Spearman)

### **Conclusioni**

Dai risultati ottenuti si evidenzia come un approccio multidisciplinare e multilivello abbia permesso di ottenere valutazioni di tipo ambientale maggiormente significative. Esso fornisce informazioni utili alla conoscenza dello stato ambientale e rafforza la necessità di studi multidisciplinari e multilivello soprattutto nei siti in cui non si raggiungono gli obiettivi di qualità ambientale.

Il set di indicatori analizzati, infatti, copre intervalli diversi di informazione e ne rafforza l'utilità in condizioni di stress ambientale, per individuare il livello di compromissione dell'ecosistema e consentire di attuare sistemi di gestione e ripristino.

### **Riferimenti bibliografici:**

- Buffagni A., Erba S. (2007). Macroinvertebrati acquatici e direttiva 2000/60/EC (WFD) , Notiziario dei Metodi Analitici, marzo 2007 (1): 94-100.
- Castelli A., Lardicci C., Tagliapietra D. (2003). Capitolo IV: Il macrobenthos di fondo molle. Biol. Mar. Medit.10 (Suppl.): 109-144.
- Ciadamidaro S., Puccinelli C., Mancini L. (2012). Studio dell' ecologia dei piccoli corsi d'acqua della Provincia di Roma. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Rapporti ISTISAN 12/33.
- Ciceri G., Fontana P., Meloni M.L. (2001). Linea guida per il campionamento e la preparazione dei campioni per la caratterizzazione di siti contaminati e risultati delle prove di laboratorio di qualificazione di alcuni prodotti coadiuvanti di bonifica. Rapporto CESI A1/039094.
- Gustavino B., Cacioli S., Mancini L. (Ed). Linea guida del test dei micronuclei in *Vicia faba* per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. [Rapporti ISTISAN 13/27].
- Italia. Decreto Ministeriale 8 novembre 2010, n. 260. Regolamento recante «Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali - Modifica norme tecniche Dlgs 152/2006. Gazzetta Ufficiale n.30 del 7-02-2011 - Supplemento Ordinario n. 31
- ISO 6341, 2012. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.
- ISPRA 2007. Andreani P., Battegazzore M., Belfiore C., Bernabei S., Buffagni A., Casino N., Ciadamidaro S., Damiani G., Erba S., Floris B., Le Foche M., Mancini L., Martone C., Morisi A., Pace G., Pagnotta R., Siligardi M. (2008). Protocollo di campionamento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua guadabili. "Manuale Metodi biologici per le acque-Parte I".
- Mancini L., Fidente R.M. (Ed.). (2007). La Direttiva Quadro 2000/60/EU sulle

acque: stato dell'arte della normativa europea. Roma: Istituto Superiore di Sanità; Rapporti ISTISAN 07/36.

-Rizzoni M., Gustavino B., Ferrari C., Gatti L.G., Fano E.A. (1995). An integrated approach to the assessment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: A mutagenesis assay (micronucleus test) and an analysis of macrobenthic community structure. *Sci Total Environ* 1995; 162:127-37.

-UNI EN ISO 11348-2, 2007. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) Method using liquid-dried bacteria.

-US-EPA, 1991. Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal, n. 503/8-91/001.

# BATTERIE DI SAGGI ECOTOSSICOLOGICI: SINTESI E PROSPETTIVE DOPO 13 ANNI DI CONTROLLI AMBIENTALI IN PROVINCIA DI CUNEO

di M. Aragno <sup>a</sup>, P. Cometto <sup>b</sup>, T. Beccaria , M. Ghigo, M. Vincenzi

<sup>a</sup> m.aragno@arpa.piemonte.it

<sup>b</sup> p.cometto@arpa.piemonte.it

---

Il D.Lgs. 152/06 e s.m.i. ha reso obbligatorio il test ecotossicologico per gli scarichi civili ed industriali e, per aumentare gli elementi conoscitivi delle cause di degrado, si sono previste analisi ecotossicologiche anche per le acque superficiali e altre matrici ambientali.

Dal 2001 il Laboratorio Arpa di Cuneo analizza diverse tipologie di campioni utilizzando una batteria composta da tre organismi target: *Daphnia magna* (UNI EN ISO 6341), *Vibrio fischeri* (APAT CNR-IRSA Metodo 8030 Man 29/2003), *Pseudokirchneriella sub capitata* (UNI EN ISO 8692).

Negli anni sono stati processati in totale 3561 campioni con una media annuale di 275 di cui il 45% circa sono acque reflue di depurazione; nella Tabella 1 vengono esplicitate le diverse matrici analizzate.

Tabella 1: Matrici analizzate

Acque profonde	1066
Acque depurazione insediamenti industriali	734
Acque depurazione insediamenti civili	859
Acque superficiali	509
Suolo	66
Fanghi depurazione/ compost	126
Rifiuti	38
Neve	136
Reflui civili fognari	27
<b>Totale</b>	<b>3561</b>

Dall'analisi dei risultati ottenuti si è riscontrato che il 27% dei campioni processati (953 in totale) sono risultati tossici per almeno un parametro ricercato; nel grafico 1 viene visualizzata la percentuale dei campioni analizzati suddividendoli tra tossici (parte rossa dell'istogramma) e non tossici (parte verde).

Nella Tabella 2 invece, i campioni testati nel corso degli anni vengono suddivisi in base alle matrici indicando per ogni tipologia i campioni tossici da quelli non tossici.

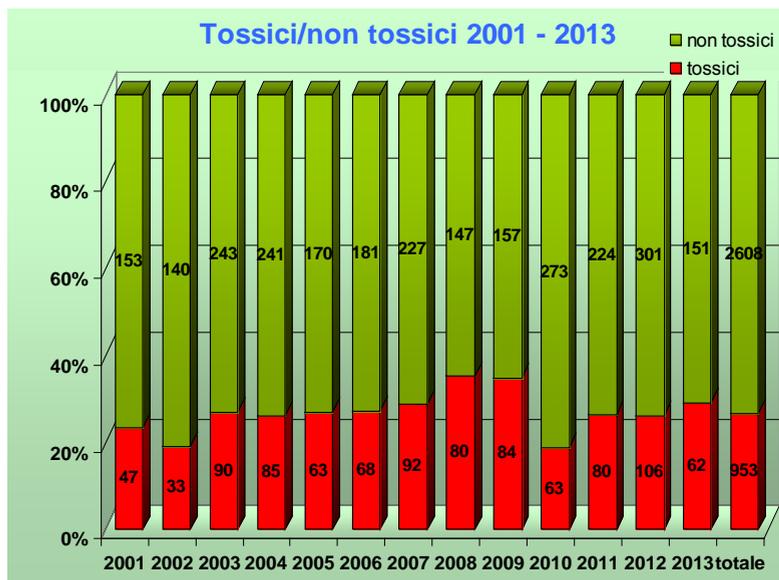


Grafico 1: Suddivisione annuale dei campioni tossici / non tossici

Tabella 2: Suddivisione campioni tossici / non tossici per tipologia di campione

Campioni	Totale	Tossici	Non tossici
1 - Acque profonde	1066	241	825
2 - Acque depurazione insediamenti industriali	734	197	537
3 - Acque depurazione insediamenti civili	859	244	615
4 - Acque superficiali	509	47	462
8 - Neve	136	48	88
9 - Reflui civili fognari	27	19	8
7 - Rifiuti	38	37	1
6 - Fanghi depurazione / Compost	126	90	36
5 - Suolo	66	30	36
<b>Totale</b>	<b>3561</b>	<b>953</b>	<b>2608</b>

Nei campioni di acque reflue degli insediamenti produttivi si evidenzia che alte percentuali di tossicità sono presenti soprattutto negli scarichi di autolavaggi, lavanderie, aziende di recupero rifiuti ed impianti industriali di fotolitografica.

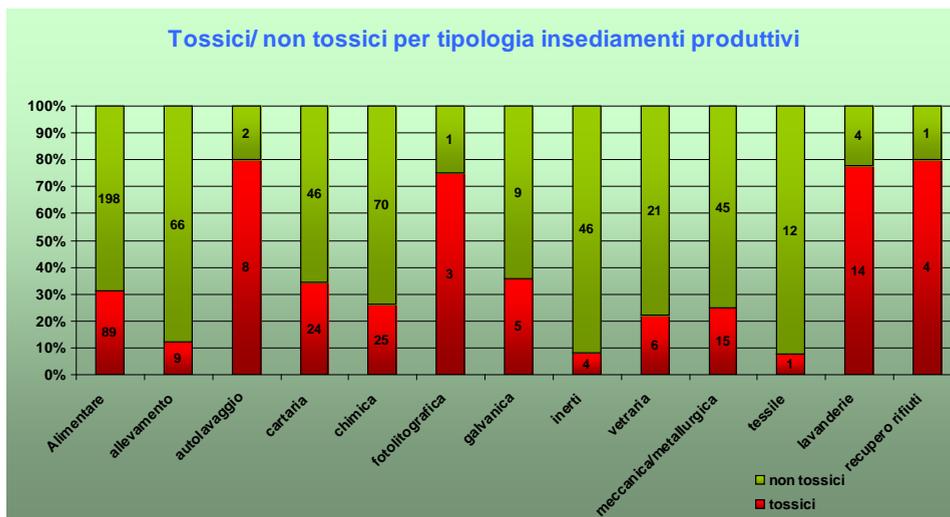


Grafico 2: Suddivisione dei campioni tossici / non tossici per insediamenti produttivi

Nel grafico 3 viene rappresentata la percentuale di tossicità ripartita per gli organismi testati nel corso degli anni rispetto alle tre tipologie di matrici più frequentemente analizzate dal nostro laboratorio: acque reflue di depuratori sia civili che industriali ed acque profonde prelevate da piezometri di discariche per il controllo del rischio di contaminazione delle falde.

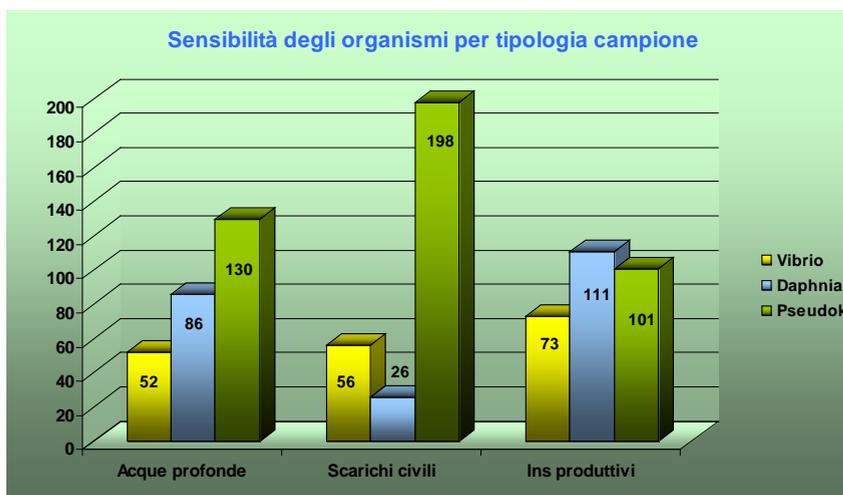


Grafico 3: Sensibilità degli organismi per le seguenti classi di campione: Acque profonde, Scarichi civili, Scarichi Insediamenti produttivi

Dai dati raccolti risulta che gli organismi utilizzati nei tests presentano una diversa sensibilità rispetto alla tipologia della matrice; le acque reflue provenienti dai depuratori civili presentano una spiccata tossicità per la *Pseudokirchneriella*

*subcapitata* ( 46% dei casi), mentre il 50% dei reflui industriali risultano tossici al parametro *Daphnia magna*. Si nota, invece, che le acque dei piezometri presentano una tossicità intorno al 30% per i tre organismi bersaglio utilizzati. La sensibilità del *Vibrio fischeri* risulta distribuita quasi uniformemente alle tre tipologie considerate. (Tabella 3)

Tabella 3: Sensibilità degli organismi per le seguenti classi di campione: Acque profonde, Scarichi civili, Scarichi Insediamenti produttivi

	Acque profonde	Scarichi depuratori civili	Scarichi depuratori industriali
<i>Daphnia magna</i>	39%	26%	49%
<i>Vibrio fischeri</i>	29%	31%	40%
<i>PseudoKirschneriella subcapitata</i>	24%	46%	24%

Limitatamente alla matrice acque reflue, la presenza di non conformità chimica non necessariamente implica la presenza di tossicità e viceversa; in effetti la presenza di tossicità nella maggior parte dei campioni è il risultato di una forma di sinergia di fattori chimici che vengono ricercati o sostanze tossiche presenti nel campione che non vengono analizzate in laboratorio e pertanto sconosciute.

Nel grafico 4 si evidenzia che nella maggior parte dei campioni non conformi al D. Lgs. 152 presentano una tossicità per la parte biologica mentre risultano conformi per la parte chimica.

Questo fatto risulta evidente sia nelle acque reflue depurate degli impianti civili e sia negli scarichi di insediamenti produttivi.

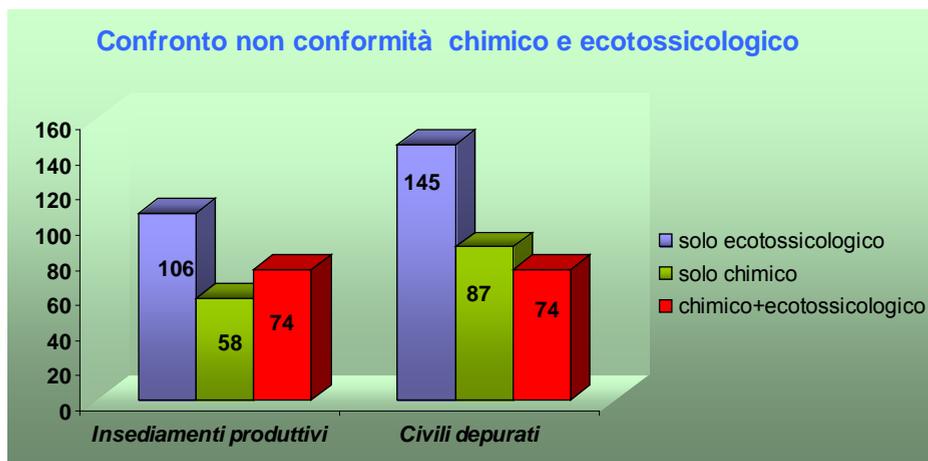


Grafico 4: Confronto tra dato chimico ed eco tossicologico per le acque reflue

Analizzando i parametri chimici che hanno determinato una non conformità del campione per i parametri: metalli, BOD5, COD spesso è associata una tossicità mentre il superamento dei limiti per altri parametri chimici come azoto nitroso, solidi sospesi spesso non danno luogo a tossicità del campione.

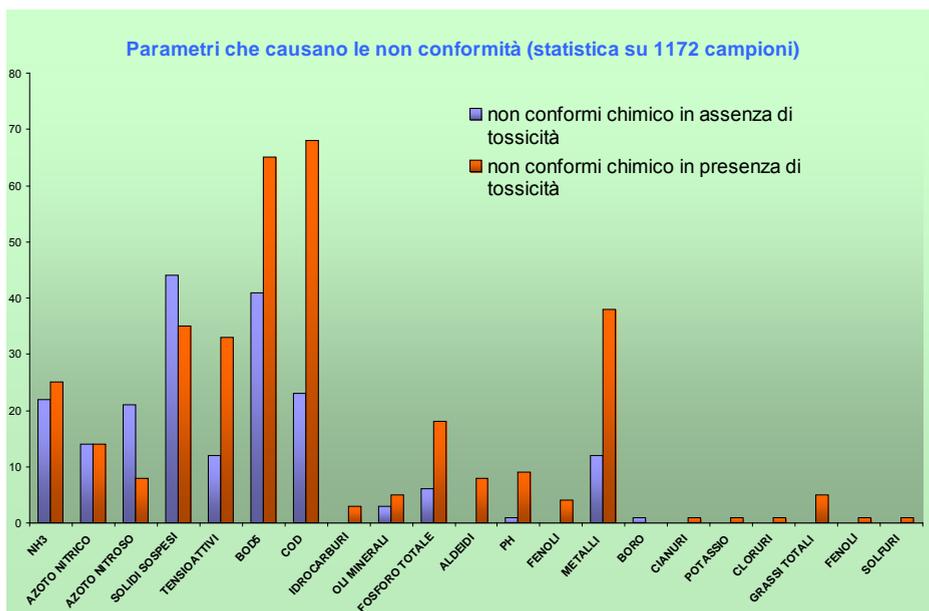


Grafico 5: Confronto tra parametri chimici e assenza/presenza di tossicità [Acque reflue].

### Conclusioni:

Dall'esperienza maturata nel corso di questi anni si evidenzia che:

- Su tutte le matrici risulta determinante eseguire una batteria di tests ecotossicologici in quanto gli organismi presentano una diversa sensibilità agli inquinanti contenuti nei campioni da analizzare.
- Le Autorizzazioni Integrate Ambientali (AIA) per la nostra provincia prevedono un solo test ecotossicologico [*Daphnia magna*] limitando così l'indagine ecotossicologica. Sorge quindi il dubbio che la scelta di ridurre i parametri da ricercare possa portare quindi a risultati non completamente esaurienti al fine di conoscere realmente l'impatto ambientale di un campione di scarico o di altri inquinanti in quanto l'impiego di un organismo test anziché di una batteria riduce la probabilità di riscontrare una tossicità del campione.
- Occorre tenere presente che spesso la tossicità di un campione è legata a fattori non conosciuti o a un effetto sinergico di sostanze chimiche presenti; questo si può rilevare solo eseguendo una batteria di tests ecotossicologici.

# IL PROGETTO CARISMA: UN ESEMPIO DI MONITORAGGIO AMBIENTALE INTEGRATO PER LA DEFINIZIONE DEL RISCHIO ECOLOGICO DA AGENTI ANTI VEGETATIVI.

*di Sonia Manzo <sup>A\*</sup>, Giuliana Ansanelli <sup>A</sup>, Giuseppe Di Landa <sup>A</sup>, Antonio Salluzzo <sup>A</sup>, Carmine Minopoli <sup>A</sup>, Bruno Lanza <sup>A</sup>, Juri Rimauro <sup>A</sup>, Paolo Massanisso <sup>B</sup>, Luisa Parrella <sup>C</sup>, Simona Schiavo <sup>C</sup>, Pellumb Aleski <sup>D</sup>, Afrim Tabaku <sup>F</sup>.*

<sup>°</sup> ENEA CR Portici. Piazz.le E. Fermi 1 - 80055 Portici (NA)

<sup>°</sup> ENEA/UTPRA-GEOC, CR Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Roma

<sup>°</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II- Criacq

<sup>°</sup> Food Safety and Veterinary Institute, Rr. Aleksandër Moisiu no.10, Tirana, Albania

<sup>°</sup> Aldent University, Rr.e Dibrës Nr. 235, Tirana, Albania

\* Corresponding author.

---

## Abstract

Nell'ambito del progetto Carisma è stata effettuata una valutazione della contaminazione da biocidi (rame, zinco, Irgarol, Diuron e tributilstagno) impiegati nelle pitture antivegetative, nei principali porti di Puglia ed Albania, in diversi periodi della stagione nautica.

Sono state condotte analisi chimiche ed ecotossicologiche su diverse matrici dell'ambiente marino ed una valutazione del rischio ecologico secondo un approccio di tipo probabilistico.

Il tributilstagno, sebbene bandito da anni, risulta presente, in ogni matrice, a concentrazioni che costituiscono un elevato pericolo per l'ecosistema marino in quasi tutti i siti campionati. Il Diuron e lo zinco non mostrano livelli preoccupanti, mentre l'Irgarol ed il rame superano i livelli di guardia soprattutto in alcuni siti pugliesi.

L'analisi di rischio, in accordo con le analisi chimiche, evidenzia potenziali effetti avversi da tributilstagno, in quasi tutti i porti, e da Irgarol, limitatamente ai porti pugliesi di San Foca e Otranto. Il rischio ecotossicologico mostra livelli medio-alti in entrambe le aree investigate.

## Keywords

Pitture antivegetative, TBT, Irgarol, Diuron, metalli, Puglia, Albania, Analisi di Rischio Ecologico

## 1. Introduzione

Carisma (Caratterizzazione, chimico fisico ecotossicologica, ed Analisi Rischio ecologico di biocidi antivegetativi nel Sud del Mar Adriatico), progetto triennale nell'ambito dell'Accordo di Collaborazione Scientifica e Tecnologica fra Italia e Albania, cofinanziato dal Ministero degli Affari Esteri (MAE), ha lo scopo di valutare la qualità ambientale del tratto di Mar Adriatico compreso fra Italia (regione Puglia) ed Albania, relativamente alla contaminazione da biocidi antivegetativi.

Attualmente, nelle pitture antivegetative (AF), si utilizzano, come agenti tossici verso gli organismi responsabili del fouling, metalli, quali rame e zinco, e composti organici, come Irgarol e Diuron. Questi ultimi risultano fra i biocidi più persistenti con tendenza ad accumularsi nell'ambiente e ad esercitare effetti tossici per lungo tempo sugli

organismi acquatici. Pertanto, l'UE li ha inclusi fra le sostanze per le quali esiste una priorità di monitoraggio (sostanze prioritarie).

Anche il tributilstagno (TBT), biocida ampiamente utilizzato in passato e poi bandito dalla comunità internazionale (IMO – International Maritime Organization) a partire dal 2008, è classificato come sostanza pericolosa prioritaria (Direttiva 2000/60/CE) a causa della sua tossicità, persistenza e capacità di bioaccumulo.

Oltre alle analisi chimiche di TBT, Irgarol e Diuron ed ai saggi ecotossicologici, è stata eseguita un'analisi probabilistica di rischio ecologico (ERA) per valutare il rischio di potenziali effetti avversi per l'ecosistema marino e definire in modo più approfondito lo stato ambientale delle aree monitorate.

## 2. Siti di campionamento/area di studio

Seguendo un approccio conservativo, come siti di campionamento sono stati scelti i porti che, per l'elevata presenza di imbarcazioni, dovrebbero rappresentare lo scenario peggiore: in Italia (Puglia) l'indagine ha riguardato 6 porti, di diversa tipologia e con un elevato numero di ormeggi, oltre ad un'area marina protetta (Torre Guaceto) mentre, in Albania, sono stati selezionati cinque fra i porti più importanti (Fig. 1). I campionamenti sono stati effettuati con frequenza annuale, sia durante la stagione nautica (a settembre 2012 e luglio 2013) che durante l'inverno (marzo 2014), quando il traffico nautico è molto meno intenso.

In tutti i siti di monitoraggio sono stati prelevati campioni acquosi e, quando possibile, sedimento e biota (mitili).



Figura 1. Siti di campionamento in Italia (verde) ed in Albania (rosso), con l'indicazione della tipologia, delle sigle identificative e del numero di ormeggi.

## 3. Materiali e metodi

L'analisi dei campioni acquosi è stata effettuata come descritto in Manzo et al. (2013) per i metalli e in Manzo et al. (2014a) per TBT, Irgarol e Diuron.

L'analisi del TBT nei sedimenti è descritta in Chiavarini et al. (2003).

I metalli sono stati estratti dai sedimenti mediante digestione acida ( $\text{HNO}_3$  67%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e HF 47%, 4:2:1 v/v/v) secondo la seguente procedura: 5 min a 300 W; 5 min a 600 W; 15 min a 1000 W e, infine, 10 min a 0 W per il raffreddamento, usando un forno a microonde Multiwave. L'eccesso di HF è stato rimosso con una seconda mineralizzazione nel microonde con  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . L'analisi è stata effettuata con ICP-MS.

Per l'estrazione di Irgarol e Diuron da sedimento, a 2 g di campione secco sono stati aggiunti 5 ml di H<sub>2</sub>O Milli-Q e, dopo agitazione magnetica, sono stati aggiunti 20 ml di metanolo (MeOH). Tale soluzione è stata sottoposta in successione ad agitazione, sonicazione e centrifugazione. Dopo il recupero del surnatante, è stata ripetuta l'estrazione con altri 20 ml di MeOH. Gli estratti riuniti sono stati sottoposti ad evaporazione ed il concentrato è stato diluito con H<sub>2</sub>O Milli-Q e caricato su cartucce SPE per l'estrazione degli analiti target, secondo la procedura seguita per i campioni acquosi.

L'analisi ecotossicologica dei campioni di acqua e delle matrici acquose dei sedimenti e la relativa integrazione nell'indice integrato di tossicità (TIB) sono state condotte come riportato in Manzo et al. (2014b). I valori calcolati dell'indice permettono di ottenere una valutazione della percentuale di rischio ecotossicologico per ogni porto.

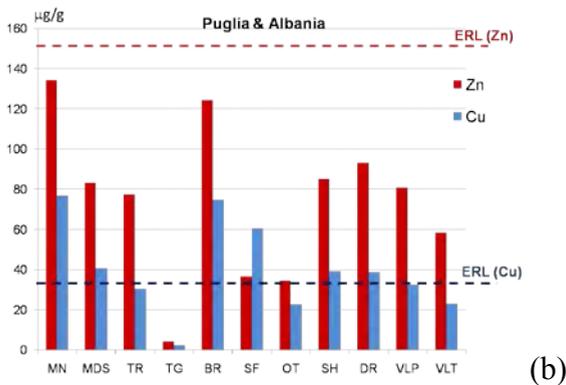
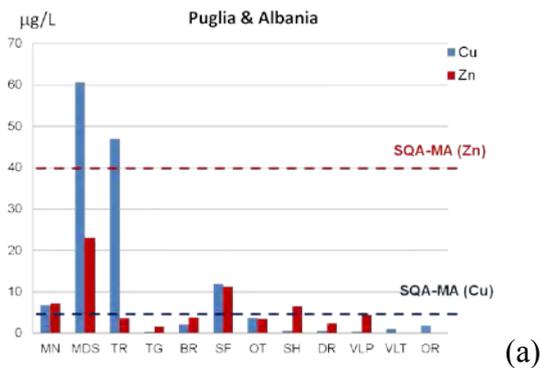
L'analisi probabilistica di rischio ecologico è stata eseguita come descritto nella Guidelines for Ecological Risk Assessment US EPA (1998). I valori soglia di tossicità, corrispondenti al 5th percentile delle distribuzioni delle concentrazioni degli effetti, sono stati ottenuti come descritto in Di Landa et al. (2009) per l'Irgarol ed il Diuron ed in Hall et al. (2000) per il TBT. Il risultato finale per ogni contaminante esaminato è stato espresso come percentuale della probabilità di eccedenza del 5th percentile in ogni porto investigato.

#### ***4. Risultati e Discussione***

##### Metalli

Per una più approfondita caratterizzazione, da un punto di vista chimico, dei siti considerati (ambienti portuali), è stata misurata la concentrazione di diversi metalli che sono impiegati in numerose attività di gestione di un porto (Tab. 1). Tuttavia, in questo lavoro, la discussione dei risultati ottenuti, è stata limitata ai principali metalli contenuti nelle pitture AF e cioè rame e zinco.

Le concentrazioni medie triennali di rame nelle acque pugliesi, in quattro località (MDS, TR, SF e MN) su sette sono superiori a 5 µg/L che rappresenta lo standard di qualità ambientale espresso come concentrazione media annua (SQA-MA), adottato nel Regno Unito su indicazione del Water Research Center (WRC). Nei porti albanesi la situazione è decisamente migliore, con livelli medi di rame che variano da 0,4 µg/L a VLP fino a 1,8 µg/L a OR.



**Figura 2.** Concentrazioni medie triennali di Cu e Zn nelle acque (a) e nei sedimenti (b). Errore associato alle misure <5%.

I livelli medi triennali di zinco rispettano sempre lo SQA-MA di 40 µg/L indicato dal WRc, nelle acque di tutti i siti campionati.

Le concentrazioni medie triennali di rame nei sedimenti raccolti nei porti pugliesi vanno da un valore minimo di 2,2 µg/g s.s., misurato nell'area marina protetta di TG, fino ad un massimo di 76,7 µg/g s.s., registrato nel porto di MN. Per il rame il valore di ERM (Effect Range Medium) indicato dal NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) è pari a 270 µg/g s.s. e quello di ERL (Effect Range Low) è 34 µg/g s.s.. Tutte le concentrazioni misurate in Puglia ed Albania sono al di sotto dell'ERM; tuttavia, in più di un caso (MDS, MN, BR e SF) si rilevano concentrazioni superiori al limite di ERL, fino a valori di 76,7 µg/g s.s. (MN). Concentrazioni di tanto superiori all'ERL indicano che i sedimenti possono essere potenzialmente tossici e, pertanto, sono necessarie ulteriori indagini al fine di verificare l'esistenza di un rischio per le popolazioni acquatiche locali.

In Albania, la contaminazione da rame nei sedimenti è più bassa: i porti più inquinati sono SH e DR con concentrazioni medie triennali pari rispettivamente a 39,1 e 38,7 µg/g s.s., quindi, di poco superiori al limite di ERL, mentre a Valona, in entrambi i porti, si misurano concentrazioni medie inferiori a tale limite.

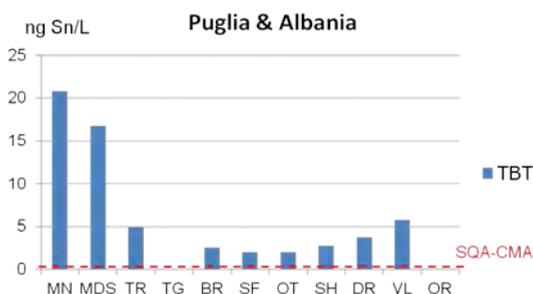
Sia in Puglia che in Albania, le concentrazioni medie di zinco nei sedimenti sono sempre < ERL (150 µg/g s.s.). In Puglia, a parte l'area marina protetta di TG che presenta livelli medi di 4,2 µg/g s.s., i siti meno contaminati sono OT e SF, mentre quelli più inquinati sono MN e BR.

## TBT

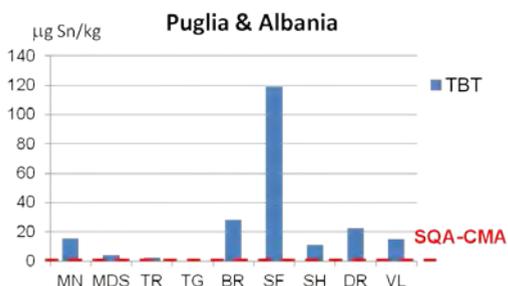
Nonostante le pitture AF a base di TBT siano proibite dal 2008 per le imbarcazioni di qualunque dimensione, questo biocida è pressoché ubiquitario. Infatti, in Puglia, la sua presenza si rileva nelle acque di tutti i siti di campionamento, ad eccezione dell'area marina protetta di TG, con concentrazioni medie nel triennio che variano dai 2 ng Sn/L di SF e OT fino ai 20,8 ng/L di MN.

In Albania, il TBT è stato trovato nelle acque di tutti i porti, eccetto OR, con valori compresi fra i 2,7 ng Sn/L di SH ed i 5,7 ng Sn/L dell'area di Valona (mediata sui due porti VLP e VLT).

Tali concentrazioni superano di gran lunga lo standard di qualità ambientale espresso come concentrazione massima ammissibile (SQA-MCA: 0,62 ng Sn/L; WFD 2008/105/EC) e, pertanto, sono indice di una situazione ambientale compromessa.



a)



b)

**Figura 3.** TBT a) nelle acque costiere e b) nei sedimenti albanesi e pugliesi. Errore associato alle misure <10%.

**Tab.1. Concentrazione dei principali metalli pesanti rilevati nei siti di campionamento albanesi e pugliesi.**

Metalli	MN		MOS		TR		SH		DR		VLP			
	Acq (µg/L)	Sed(mg/kg)	Acq (µg/L)	Sed (mg/kg)	Acq (µg/L)	Sed (mg/kg)	Acq (µg/L)	Sed (mg/kg)	Acq (µg/L)	Sed (mg/kg)	Acq (µg/L)	Sed (mg/kg)		
Cu <sup>a</sup>	151.8	89.7	0.4; 2.9	26.8	0.6; 0.5	54.7	0.2; 0.1	47.7	<0.1; 0.2	52.8	<0.1; 0.2	-		
Zn <sup>a</sup>	12.9; 11.5	168.6	2.2; 14.2	49.8	3.2; 6.5	126.6	3.2; 19.5	112.2	3.3; 3.4	117.5	4.3; 6.2	-		
Sn <sup>a</sup>	<0.1 <sup>f</sup>	5.9	<0.1 <sup>f</sup>	1.4	<0.1 <sup>f</sup>	4.2	<0.1; 0.1	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	-		
As <sup>a</sup>		15.6		5.6		21.5		13.4		11.1		-		
Co <sup>a</sup>	<0.1; 0.5	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>		
Ca <sup>a</sup>	<0.1 <sup>f</sup>	14.9	<0.1 <sup>f</sup>	25.5	<0.1 <sup>f</sup>	16.1	<0.1 <sup>f</sup>	23.0	<0.1 <sup>f</sup>	21.6	<0.1 <sup>f</sup>	-		
Cr <sup>a</sup>		99.3		39.4		71.1		293.4		439.2		-		
In <sup>a</sup>		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		-		
Mn <sup>a</sup>	0.4; <0.1	705.9	<0.1; 0.3	88.6	<0.1; 0.1	1044.4	0.1; 0.2	1041.8	<0.1 <sup>f</sup>	537.1	<0.1 <sup>f</sup>	-		
Mo <sup>a</sup>		2.1		0.6		2.1		1.1		1.0		-		
Ni <sup>a</sup>	0.7; 1.0	45.8	0.8; 1.3	13.9	0.8; 1.1	38.3	0.6 <sup>f</sup>	205.5	<0.5 <sup>f</sup>	226.8	<0.5 <sup>f</sup>	-		
Pb <sup>a</sup>	0.1; 0.3	49.8	<0.1 <sup>f</sup>	17.1	<0.1; 0.2	34.1	0.2 <sup>f</sup>	11.3	<0.1 <sup>f</sup>	17.2	<0.1 <sup>f</sup>	-		
Sb <sup>a</sup>		0.1		0.3		0.6		<0.1		<0.1		-		
V <sup>a</sup>		129.0		58.5		101.6		94.9		95.5		-		
	MN <sup>a</sup>	MN <sup>b</sup>	MN <sup>c</sup>	MOS	TR	TG	BR	SF	QT	SH	DR	VLP	VLT	DR
	Acqua di mare 2013 (µg/L)													
Cu <sup>d</sup>	11.9	11; 2.9-14 <sup>a</sup>	0.7-1.3 <sup>c</sup>	119.7	93.4	0.3	2.5; 1.6	11.6; 12.1	2.1; 5.2	0.6; 1.3	0.7; 1.4	<0.1; 1.3	0.1 <sup>b</sup>	1.8 <sup>b</sup>
Zn <sup>d</sup>	2.4	2.7; 7.4-17 <sup>a</sup>	<1-1.3 <sup>c</sup>	38.0	2.4	1.6	6.3; 1.2	10.8; 11.7	1.8; 5.4	<1; 2.9	2.5; <1	4.6; 2.4	<1.0 <sup>b</sup>	<1.0 <sup>b</sup>
Sn <sup>d</sup>	0.3	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1 <sup>f</sup>	0.1	<0.1	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>							
Co <sup>d</sup>	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1 <sup>f</sup>	0.3	<0.1	<0.1	0.1; <0.1	<0.1 <sup>f</sup>						
Ca <sup>d</sup>	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1 <sup>f</sup>	0.1	<0.1	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>							
Mn <sup>d</sup>	2.5	<0.1; 0.2-0.1 <sup>b</sup>	<0.1; 0.2 <sup>c</sup>	9.5	4.1	<0.1	<0.1 <sup>f</sup>	0.2; 0.3	<0.1 <sup>f</sup>	0.7; 1.1	<0.1 <sup>f</sup>	0.1; 0.5	<0.1 <sup>f</sup>	0.4 <sup>b</sup>
Ni <sup>d</sup>	<0.5	<0.5 <sup>f</sup>	<0.5 <sup>f</sup>	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5 <sup>f</sup>							
Pb <sup>d</sup>	31.3	0.9; 2.2-19 <sup>a</sup>	<0.1 <sup>f</sup>	1.1	100.4	<0.1	8.4; 0.3	0.7; 1.3	0.9; 0.6	3.2; 0.1	0.2-0.1	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1 <sup>f</sup>	<0.1 <sup>f</sup>
	Sedimenti 2013 (mg/kg)													
Cu <sup>d</sup>	30.1	62.9; 157.8	-	34.2	28.9	2.0	49.5	99.6	24.1	42.1	24.2	24.9	23.6	-
Zn <sup>d</sup>	79.3	127.1; 183.5	-	79.5	76.2	3.5	89.2	61.0	32.6	88.0	63.6	60.7	49.2	-
Sn <sup>d</sup>	2.9	6.4; 6.6	-	2.1	1.9	0.2	3.6	1.9	1.4	2.5	1.7	2.1	1.4	-
As <sup>d</sup>	11.8	15.2; 16.1	-	9.3	11.3	3.6	8.7	3.5	6.2	18.1	7.6	11.6	8.7	-
Co <sup>d</sup>	0.1	<0.1; 0.2	-	0.1	0.1	<0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	-
Ca <sup>d</sup>	11.8	19.1; 16.3	-	13.1	23.9	22.1	11.5	7.5	40.4	26.4	17.6	14.1	17.0	-
Cr <sup>d</sup>	55.9	98.4; 87.5	-	41.8	396.4	7.9	44.8	16.4	27.0	372.2	491.0	38.9	362.6	-
In <sup>d</sup>	<0.1	<0.1	-	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-
Mn <sup>d</sup>	530.4	843.8; 572.0	-	661.5	678.8	190.6	253.0	116.3	112.4	969.2	495.7	647.7	531.9	-
Mo <sup>d</sup>	1.2	1.6; 2.5	-	0.7	0.3	<0.1	1.5	5.2	1.6	1.3	0.5	1.4	0.5	-
Ni <sup>d</sup>	28.4	40.2	-	19.8	184.2	3.0	18.6	7.8	16.1	199.1	141.6	18.3	12.5	-
Pb <sup>d</sup>	26.8	42.4; 62.9	-	22.0	26.3	4.0	39.2	15.7	20.2	23.4	15.0	20.7	14.3	-
Sb <sup>d</sup>	0.6	0.7 <sup>f</sup>	-	0.5	0.4	<0.1	0.6	0.3	0.5	0.9	0.4	0.6	0.4	-
V <sup>d</sup>	94.8	130.2; 104.6	-	57.2	64.8	6.6	44.5	12.6	15.3	130.9	71.6	58.4	56.7	-
	Sedimenti 2014 (mg/kg)													
Cu				61.0	7.6	2.5	99.9	21.2	20.9	27.5	39.2	39.9	22.2	-
Zn				120.7	29.3	4.9	159.3	12.2	36.3	55.3	98.1	100.8	67.5	-
Sn				3.2	1.3	<0.1	6.7	<0.1	1.1	1.4	2.7	2.6	1.7	-
As				10.0	6.1	2.5	12.6	1.3	5.1	11.2	11.8	7.7	10.4	-
Co				<0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-
Ca				13.1	6.4	19.9	12.2	1.0	13.8	16.7	22.9	17.2	21.8	-
Cr				70.0	23.0	7.4	49.2	5.7	20.0	216.4	448.2	303.2	629.1	-
In				<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	-
Mn				587.2	800.7	217.8	201.6	102.3	101.8	875.7	576.3	646.5	639.6	-
Mo				4.1	0.4	<0.1	2.7	0.3	4.4	0.7	0.8	0.9	0.9	-
Ni				27.7	9.5	3.0	20.5	3.2	10.5	146.9	224.8	173.3	211.8	-
Pb				34.1	15.5	5.1	94.3	5.5	19.2	16.3	27.6	34.1	21.6	-
Sb				0.7	0.2	<0.1	0.9	<0.1	0.3	0.5	0.6	0.4	0.4	-
V				94.0	32.1	6.1	54.1	4.4	16.1	68.3	119.8	66.6	73.4	-

a: campionamenti effettuati a luglio 2013 al centro del porto (c.p.) e presso la banchina; b: campionamenti effettuati il 2 dicembre 2013 al c.p. e presso due banchine diverse; c: campionamenti

del 13 dicembre 2013 presso due banchine diverse; **d**: il primo valore si riferisce ai campionamenti effettuati al c.p. ed il secondo valore ai campionamenti eseguiti dalla banchina; **e**: i valori si riferiscono a due banchine diverse; **f**: stessa concentrazione per c.p. e banchina/e; **g**: stessa concentrazione per entrambe le banchine; **h**: campionamento da banchina. - : non campionato

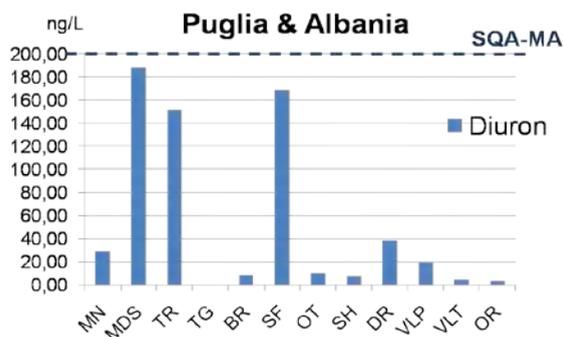
A parte l'area marina protetta di TG, nei sedimenti di tutti i porti esaminati, albanesi e pugliesi, è sempre stata riscontrata la presenza del TBT in quantità medie (nel triennio) comprese fra i 2,5 µg Sn/kg di TR ed i 119 µg Sn/kg di SF che risulta, pertanto, il sito più inquinato da TBT. In tutti i casi la qualità dei sedimenti, relativamente alla contaminazione da TBT, è scadente. Infatti, l'SQA-CMA per il TBT nei sedimenti è pari a 2 µg Sn/kg [2008/105/CE], valore sempre superato, spesso in modo rilevante.

Inoltre, nei mitili sono state trovate concentrazioni di TBT con valori compresi fra 120 (SH) e 843 ng/g p.s. (MDS). Tali livelli sono molto maggiori di 12 ng/g p.s. che è il valore limite raccomandato, ai fini di un buono stato ambientale, dalla Commissione per la protezione dell'ambiente marino baltico (Commissione di Helsinki - HELCOM) e, dunque, rappresentano un rischio non solo per i mitili, ma anche per la salute degli esseri umani, attraverso la contaminazione della catena alimentare.

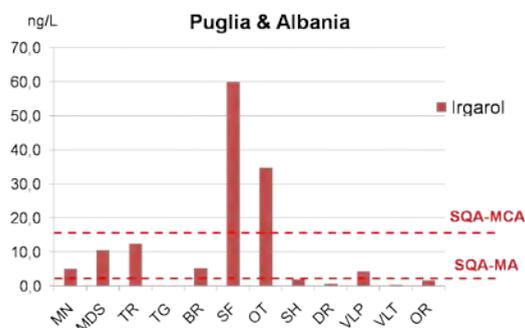
#### Irgarol e Diuron

Il diuron si rileva nelle acque di tutti i siti di campionamento, ad eccezione di TG. Le concentrazioni sono sempre inferiori allo standard di qualità SQA-MA (200 ng/L).

Per quanto riguarda l'Irgarol, la situazione in Albania è complessivamente buona, con livelli medi sempre inferiori allo SQA-MA (2,5 ng/L;) eccetto a VLP (4,2 ng/L) mentre, in Puglia, se si esclude TG, le concentrazioni sono sempre superiori a tale limite e addirittura, a SF ed OT, i livelli medi triennali superano abbondantemente anche lo SQA-MCA (16 ng/L; WFD 2000/60/CE).



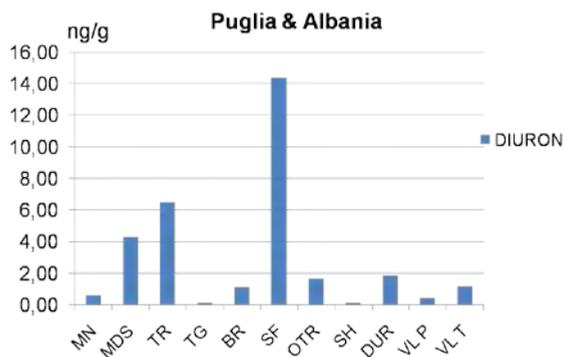
a)



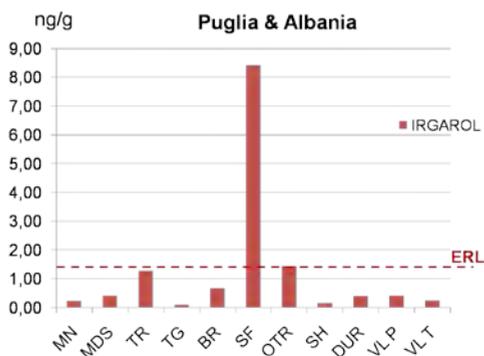
b)

**Figura 4.** Diuron (a) ed Irgarol (b) nelle acque marine pugliesi ed albanesi. Errore associato alle misure  $\leq 10\%$ .

Inoltre, sono stati misurati i livelli di Diuron ed Irgarol nei sedimenti prelevati durante la stagione nautica del 2013. Per il Diuron si registrano valori compresi fra  $<0,5$  ng/g s.s. (TG, SH) e  $14,3$  ng/g s.s. (SF). Non esistendo norme né linee guida che fissano SQA per il Diuron nei sedimenti, non è possibile valutare la qualità di questa matrice ambientale sulla base dei risultati ottenuti. Invece, per l'Irgarol, in letteratura (Van Wezel, and Van Vlaardingen, 2004) è riportato un Limite di Rischio Ambientale (ERL) che rappresenta la concentrazione oltre la quale può verificarsi il rischio potenziale della sostanza chimica per l'ecosistema ed è pari a  $1,4$  ng/g. Nella nostra indagine, le concentrazioni misurate nei sedimenti sono sempre al di sotto di tale limite, eccetto a OT ( $1,4$  ng/g s.s.) e nel porto di SF ( $8,4$  ng/g s.s.) i cui fondali risultano i più inquinati sia da Irgarol che da Diuron.



a)



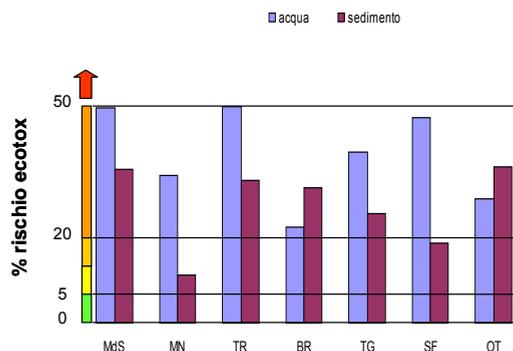
b)

**Figura 5.** Diuron [a] ed Irigarol [b] nei sedimenti pugliesi ed albanesi. Errore associato alle misure <10%.

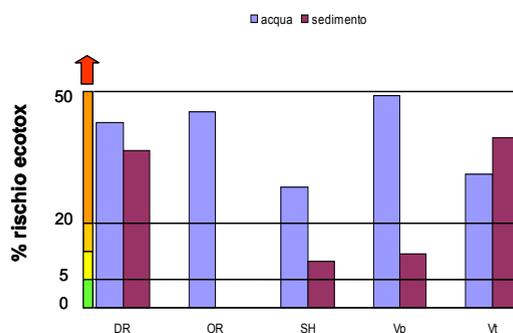
### Il rischio ecotossicologico

Le acque della Puglia evidenziano valori TIB sempre superiori al 20%, indicando la presenza di rischio ecotossicologico alto. I livelli maggiori, prossimi al 50%, si ottengono a TR, e in misura minore a MDS e SF, e quelli più bassi a BR, mentre a TG e MN si evidenzia un livello di rischio simile (circa il 40%).

Le matrici acquose dei sedimenti fanno registrare valori di rischio spesso superiori al 20%, anche se mediamente più bassi rispetto alle acque. Livelli elevati per i sedimenti sono stati ottenuti a MDS e TR; analogamente all'acqua, e a OT e BR dove il rischio misurato per le acque è minore. SF e MN fanno registrare i valori più bassi. Considerando entrambe le matrici, MDS risulta il sito a maggior rischio ecotossicologico.



a)



b)

**Figura 6.** Valori di TIB% e corrispondenti intervalli di rischio ecotossicologico calcolati per le acque e le matrici acquose dei sedimenti raccolti in a) Puglia e b) Albania. Vedi anche Ispra (2011).

In Albania, le acque campionate fanno misurare valori sempre superiori al 20% TIB, identificando un rischio ecotossicologico alto. In particolare, il livello più elevato si ottiene a VLP mentre il valore più basso si calcola per il porto di SH. Per il rischio legato alle matrici acquose dei sedimenti, il valore più elevato si registra a VLT e, analogamente alle acque, il più basso a SH. Dalla comparazione dei livelli di rischio per acque e sedimenti, notiamo che a DR e a VLT si hanno valori simili, con probabile effetto ecotossicologico derivante da contaminazione congiunta di entrambe le matrici, mentre a SH e VLP esiste un rischio ecotossicologico legato principalmente alle acque.

#### Valutazione probabilistica del rischio ecologico

Dai risultati riportati in tabella 2 è possibile notare che sia in Italia che in Albania l'uso di Diuron ed Irgarol nelle pitture AF produce effetti negativi trascurabili. Fanno eccezione solo i porti italiani di SF e OT per i quali sono messi in evidenza potenziali effetti avversi esclusivamente per l'Irgarol (probabilità di eccedenza del 5th percentile intorno al 20%). Inoltre, nei porti di entrambe le aree investigate, si evidenziano potenziali effetti negativi dovuti alla presenza di TBT nella colonna d'acqua (probabilità di eccedenza superiori al 70%).

**Tab. 2:** *Valutazione del rischio ecologico nei porti italiani ed albanesi.*

Sito	Porti	Probabilità di eccedenza 5th percentile* (%)		
		Diuron	Irgarol	TBT
Italia (regione Puglia)	Manfredonia	0,05	0,002	94
	Margherita di Savoia	7	6	85
	Trani	4	0,2	75
	Torre Guaceto	-	-	-
	Brindisi	0	0,1	92
	San Foca	0,02	18	83
	Otranto	0,3	23	93
Albania	Durazzo	0,04	0	74
	Shengjin	0	0,003	73
	Valona	0	0,1	77
	Orikum	0,3	0,5	-

\*5th percentile: Diuron = 3126 ng /l - Irgarol= 186 ng/l - TBT= 3 ng/l

#### 4. Conclusioni

L'indagine chimica ed ecotossicologica condotta su campioni di acqua, sedimento e biota, raccolti in alcuni dei principali porti pugliesi ed albanesi, evidenzia l'esistenza di situazioni di criticità e di rischio ecologico in alcuni dei siti monitorati. In particolare, tra i contaminanti esaminati, il TBT, presente a concentrazioni spesso superiori agli standard di qualità ambientale, risulta essere il più pericoloso per l'ambiente marino. Infine, relativamente agli analiti considerati, i siti albanesi risultano meno contaminati di quelli pugliesi.

Un'analisi più dettagliata dei dati raccolti è in fase di elaborazione per una descrizione approfondita dello stato di qualità ambientale del tratto di Mare Adriatico oggetto di studio.

#### Bibliografia

Chiavarini S., Massanisso P., Nicolai P., Nobili C., Morabito R., [2003]. Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*, 50: 311-319 .

Di Landa G., Parrella L., Avagliano S., Ansanelli G., Maiello E. and Cremisini C., [2009]. Assessment of the Potential Ecological Risks Posed by Antifouling Booster Biocides to the Marine Ecosystem of the Gulf of Napoli (Italy). *Water Air Soil Pollut.*, 200: 305 - 321.

Hall L. W., Jr., Scott M. C., Killen W. D., and Unger M. A., [2000]. A Probabilistic Ecological Risk Assessment of Tributyltin in Surface Waters of the Chesapeake Bay Watershed. *Human and Ecological Risk Assessment*, 6, No. 1: 141-179.

ISPRA (2011). Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. Manuali e linee guida 67/2011. ISBN: 978-88-448-0498-5.

Manzo S., Ansanelli G., Chiavarini S., Di Landa G., Fantini M., Lanza B., Massanisso P., Minopoli C., Nardi E., Parrella L., Pezza M., Salluzzo A., Schiavo S., Tabaku A., Aleski P., Lazo P. [2013]. Caratterizzazione (Chimico Fisica Ecotossicologica) ed Analisi Rischio Ecologico di Biocidi Antivegetativi nel Sud del Mar Adriatico Progetto Carisma (Cofinanziato dal MAE) Presentazione delle Attività del Primo Anno. ATTI delle Giornate di Studio, 5a edizione 2013 (Ispra).

Manzo S., Ansanelli G., Parrella L., Di Landa G., Massanisso P., Schiavo S., Minopoli C., Lanza B., Boggia R., Alekski P. and Tabaku A., [2014a]. First evaluation of the threat posed by antifouling biocides in the Southern Adriatic Sea. *Environ Sci Processes Impacts* , 16: 1981-1993.

Manzo S., Schiavo S., Aleksi P. and Tabaku A., (2014b). Application of a toxicity test battery integrated index for a first screening of the ecotoxicological threat posed by ports and harbors in the southern Adriatic Sea [Italy]. *Environ Monit Assess*, 186: 7127-7139

US EPA (1998). Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F, Washington DC.

Van Wezel, A.P. and P. Van Vlaardingen (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat Toxicol*, 66: 427-444.

# ECOTOXICOLOGICAL APPROACH FOR THE EVALUATION OF THE EFFECTS OF ANTHROPIC IMPACTS IN THE MARINE PROTECTED AREA OF LA MADDALENA (SARDINIA).

by V. Moschino<sup>a</sup>, M. Schintu<sup>b</sup>, A. Marrucci<sup>b</sup>, B. Marras<sup>b</sup>, L. Da Ros<sup>ac</sup>

<sup>a</sup> CNR ISMAR Venezia

[vanessa.moschino@ismar.cnr.it](mailto:vanessa.moschino@ismar.cnr.it); [luisa.daros@ismar.cnr.it](mailto:luisa.daros@ismar.cnr.it)

<sup>b</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Università di Cagliari

[schintu@unica.it](mailto:schintu@unica.it); [alexmarrucci@unica.it](mailto:alexmarrucci@unica.it); [bmarras@unica.it](mailto:bmarras@unica.it)

<sup>c</sup> CNR IDPA Padova

---

**Abstract** - The National Park of La Maddalena is a Site of Community Importance (SCI) under the Habitats Directive 92/43 EC. Environmental protection rules and safeguard measures for nautical activities currently in force in the Marine Protected Area (covering 78% of the total area of the Park) have helped in reducing human pressure related to tourism. However, tourism related impacts remain particularly significant in the summer period, mainly due to the high number of recreational boats sailing and mooring in areas particularly attractive. With the aim of evaluating the effectiveness of the ecotoxicological approach based on the use of biomarkers in the assessment of the possible environmental effects of tourism, an active biomonitoring approach using transplanted *Mytilus galloprovincialis* was adopted in this MPA. Mussels from a local commercial farm were transplanted in April 2013 to four marine areas affected by various anthropic impacts: the bathing area of the Relitto beach (island of Caprera), Porto Madonna (between Budelli, Razzoli and Santa Maria islands), Passo degli Asinelli (between Razzoli and Santa Maria islands) and in the marine area of the Arsenal of La Maddalena. In May, September and December 2013, sub-samples of organisms were collected from each site and the following biological measurements were carried on: lysosomal biomarkers (Neutral Red Retention Assay, lipofuscin, neutral lipids, lysosomal structural changes), condition index and mortality rate. At the same time, a set of passive samplers POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) were positioned at 10 m depth at Porto Madonna and Passo degli Asinelli in September and collected in December. On the whole, biological results have highlighted evidence of greater stress conditions in mussels deployed in the area of the Arsenal and at Porto Madonna, whereas the concentrations of endocrine disruptors extracted from the POCIS were below the method detection limit.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, biomarkers, POCIS, Marine Protected Area.

## Introduction

The National Park of La Maddalena is a Site of Community Importance (SCI) under the Habitats Directive 92/43 EC. The Marine Protected Area (MPA), which covers 78% of the total area of the Park, was instituted in 1996 to protect both the land and the sea of the various islands of the Archipelago, covering more than 15,000 hectares of sea bottom and protected sea. The Archipelago hosts an ecological relevant environment characterized by beaches, islands, dunes, in which rare terrestrial and marine species live. The regulations in force in the Park are special, and provide for areas of total protection (MA), in which navigation, scuba diving and

fishing are partially restricted or forbidden, and areas of general protection (MB), in which these activities are allowed. The environmental protection rules and safeguard measures for nautical activities have helped in reducing human pressure related to tourism. However, tourism related activities remain particularly important during the summer period, mainly due to the high number of recreational boats sailing through and mooring at especially attractive areas.

With the aim of evaluating the effectiveness of the ecotoxicological approach based on the use of biomarkers in the assessment of the possible environmental impact of tourism, an active biomonitoring approach using transplanted *Mytilus galloprovincialis* was applied in four areas of La Maddalena MPA differently affected by tourists. Moreover, the presence of endocrine disruptors in the waters was evaluated in two sites using the POCIS passive samplers.

### **Materials and Methods**

Mussels were collected in April 2013 from a marine farm area nearby, and transplanted to four marine areas through submerged structures implemented *ad hoc* by the staff of the National Park. The areas were chosen according to their different anthropic impacts: Porto Madonna, characterized by an high number of recreational boats (between Budelli, Razzoli and Santa Maria islands); Passo degli Asinelli, the reference area where navigation is forbidden (between Razzoli and Santa Maria islands), the bathing area of the Relitto beach, highly frequented by swimmers and snorkelers (island of Caprera), and the marine area of the Arsenal of La Maddalena, in front of the facilities of the abandoned military arsenal, whose sea-bed had already identified as chemically polluted (Fig. 1). In May, September and December 2013, sub-samples of organisms were collected from each site, and processed according to the various biological methods. In particular, lysosomal membrane stability was evaluated in mussel haemocytes according the Neutral Red Retention Assay (Lowe and Pipe, 1994); on the other hand, lipofuscins (Pearse 1972), neutral lipids (Bancroft, 1967) and lysosomal structural changes (Lowe et al., 1981) were determined in mussel digestive glands. Condition index and mortality rate were also measured aiming at describing the general "health status" of mussels.

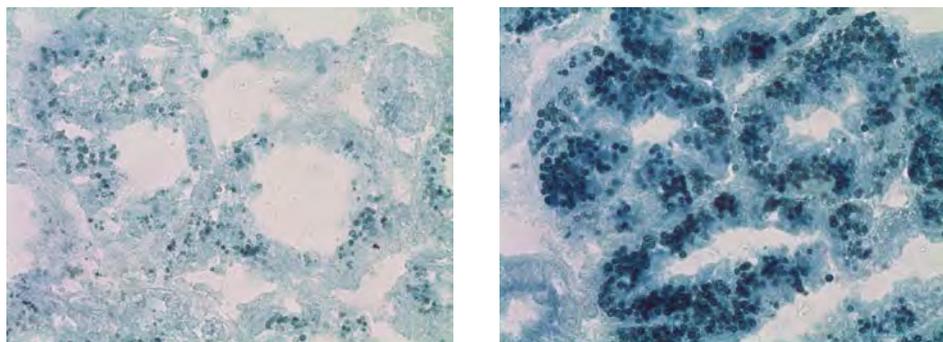
The passive samplers POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler), which extract water-soluble organic chemicals from the water column, were used to evaluate the possible presence of hydrophilic contaminants. They consist of a solid material (sorbent) contained between two microporous polyethersulfone membranes, which allow water and dissolved chemicals to pass through the sorbent where chemicals are trapped. POCIS samplers were placed at Porto Madonna and Passo degli Asinelli in September and collected in November after a 7 week exposition. POCIS extracts were analyzed by GC/MC for the determination of the following endocrine disruptors: alkylphenols, bisphenol A and steroids.



*Fig. 1 – Map of La Maddalena Archipelago and of the various sampling sites: 1 – Porto Madonna; 2 – Passo degli Asinelli; 3 – Relitto beach; 4 – Arsenale.*

### **Results**

The Neutral Red Retention Assay showed statistically significant decreases in retention times at Porto Madonna and at the Arsenale in comparison with Passo degli Asinelli in May and September [Kruskal-Wallis:  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively]. In the same samples, lipofuscins were significantly higher in mussels collected at the Arsenale with respect to those from the reference site [Kruskal-Wallis:  $p < 0.01$  in May and  $p < 0.001$  in September; Fig. 2] whereas no differences were detected among samples in neutral lipid content. Among lysosomal structural changes, only lysosomal numerical density showed differences, with significantly higher values at Porto Madonna in September [Kruskal-Wallis:  $p < 0.05$ ]. An higher mortality rate was also observed in samples transplanted at Porto Madonna. Lastly, the endocrine disruptors, i.e. alkylphenols, bisphenol A and steroids, extracted from the POCIS had concentrations which were below the method detection limit.



*Fig. 2 - Lipofuscins accumulated in mussel digestive glands from the reference site, Passo degli Asinelli (left), and from Arsenale (right).*

### ***Discussion***

The Neutral Red Retention Assay showed negative effects in mussels transplanted to Porto Madonna, indicating a condition of increased stress at the end of the summer season. According to the classification reported by Hagger et al. 2008, the mussel condition could be considered at this site as major-severe altered. This observation is further confirmed by the results of lysosomal numerical density and mortality rate.

These findings, although preliminary, indicate the suitability of the active biomonitoring approach with mussels to evaluate anthropic stress in Marine Protected Areas. In particular, the Neutral Red Retention Assay may be suggested as the most appropriate analysis, to be used as screening tool also in monitoring MPAs, due to its simplicity of execution, responsiveness and immediate availability of the results.

### ***Acknowledgements***

This study has been carried out within the Project “Pressione antropica e inquinanti prioritari nelle aree marine protette della Sardegna. La valutazione ecotossicologica quale strumento per la gestione delle aree” funded in the framework of LEGGE REGIONALE 7 AGOSTO 2007, N.7 : “PROMOZIONE DELLA RICERCA SCIENTIFICA E DELL'INNOVAZIONE TECNOLOGICA IN SARDEGNA” (Scientific coordinator Prof. Marco Schintu). We also wish to thank the staff of the La Maddalena Archipelago National Park for their logistical support. We are especially grateful to Dr Yuri Donno, for his invaluable help in positioning and sampling underwater mussels.

### ***References***

- Bancroft JD 1967. An introduction to histochemical technique. London: Butterworth.
- Lowe D, Moore M, Clarke KR 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat Toxicol* 1: 213-226.
- Lowe DM, Pipe RK 1994. Contaminant Induced Lysosomal Membrane Damage in Marine Mussel Digestive Cells - an in-Vitro Study. *Aquat Toxicol* 30: 357-365.
- Pearse AGE 1972. Histochemistry, Theoretical and Applied, vol. 2. Churchill-Livingstone, London.
- Hagger, JA, Jones MB et al. 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Mar Pollut Bull* 56: 1111-1118.

# VALUTAZIONE DELLE CONSEGUENZE AMBIENTALI DEGLI INCIDENTI RILEVANTI: CARATTERIZZAZIONE DELLE SOSTANZE PRESENTI SUL TERRITORIO NAZIONALE E RISULTANZE DELL'ANALISI DELL'ESPERIENZA STORICA DI INCIDENTI RILEVANTI CON EFFETTI AMBIENTALI

di R. Marrazzo<sup>°</sup>, F. Delli Quadri<sup>°</sup>

<sup>°</sup> ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Servizio Rischio Industriale; via V. Brancati, 48 - 00144 Roma (Italia) - romualdo.marrazzo@isprambiente.it

<sup>°</sup> ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Servizio Rischio Industriale; via V. Brancati, 48 - 00144 Roma (Italia) - fausta.delliquadri@isprambiente.it

---

**Abstract** - Il lavoro si inquadra nell'ambito delle attività, svolte dal Servizio Rischio Industriale di ISPRA, inerenti alla problematica della valutazione e gestione integrata dei rischi da incidente rilevante con conseguenze ambientali nelle aree industriali, con riferimento specifico alla caratterizzazione delle sostanze pericolose per l'ambiente, di interesse prioritario in ambito nazionale, ed all'analisi di elementi ricavabili da eventi incidentali connessi con la presenza di tali sostanze. Il presente contributo riporta gli esiti di una ricognizione ragionata di informazioni e dati inerenti a sostanze e preparati pericolosi per l'ambiente effettivamente presenti presso gli stabilimenti situati sul territorio nazionale e soggetti agli adempimenti di cui al D. Lgs. 334/99 e s.m.i. (direttiva Seveso), al fine di fornire un quadro della situazione nazionale circa i rischi ambientali di tali sostanze. È stata quindi condotta una analisi dell'esperienza storica di eventi incidentali con impatto su matrici ambientali, mediante Elaborazione di dati e informazioni tratti da RNI (Registro Nazionale Incidenti, DB di ISPRA su eventi incidentali industriali).

Keywords: incidenti rilevanti, stabilimenti, pericolosi per l'ambiente, rilasci, acque superficiali

## ***1.0 Ricognizione sulle sostanze di interesse prioritario in ambito nazionale***

Informazioni inerenti le sostanze detenute presso gli stabilimenti a rischio di incidente rilevante (RIR) sono state tratte dall'inventario nazionale (art. 15 - c.4 del D. Lgs. 334/99 e s.m.i.), basato sui dati desunti dalle notifiche (art. 6 del D. Lgs. 334/99 e s.m.i.) e dalle schede d'informazione alla popolazione (allegato V del D. Lgs. 334/99 e s.m.i.), e sono relative a: identificazione; tipologia di pericolosità; quantità presenti.

L'attività ha comportato una ricognizione iniziale delle sostanze e dei preparati pericolosi per l'ambiente presenti negli stabilimenti (9. SOSTANZE PERICOLOSE PER L'AMBIENTE, ai sensi di All. I parte 2 del D. Lgs. 334/99 e s.m.i.), consistente in una prima suddivisione in due macro-categorie individuate sulla base dell'attribuzione alle sostanze delle frasi di rischio: R50: "Molto tossico per gli organismi acquatici" (compresa R50/53) - 9.i; o R51/53 "Tossico per gli organismi acquatici; può causare effetti negativi a lungo termine nell'ambiente" - 9.ii.

I dati sono quindi "filtrati" in base a considerazioni inerenti i quantitativi effettivamente presenti negli stabilimenti. Si è in particolare ritenuto utile stabilire una "soglia minima rilevante" di effettiva presenza nel singolo stabilimento di sostanze e preparati

pericolosi per l'ambiente sul territorio nazionale, pari 10 tonnellate. Tale valore, si considera significativo, in un'ottica di valutazione integrata del rischio da incidenti rilevanti nelle aree critiche industriali, al fine di poter disporre di un quadro realistico e aggiornato della situazione italiana per gli aspetti in esame.

Per le sostanze riportate nei due macro-elenchi elaborati (sostanze e preparati pericolosi per l'ambiente categorie 9.i e 9.ii), si è provveduto ad integrare le informazioni riportate nell'inventario nazionale con quelle disponibili in letteratura e/o depositate presso il MATTM (archivio notifiche), relative in particolare a: schede di sicurezza; caratteristiche di pericolosità; frasi di rischio R; consigli di prudenza S; numeri identificativi (CAS - Chemical Abstracts Service; EINECS - European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances; CE - Codice di identificazione assegnato alla sostanza nell'allegato I della direttiva 67/548/CEE; RTECS - Registry of Toxic Effects of Chemical Substances; NU - Numero ONU; ICSC - International Safety Chemical Cards).

## ***2.0 Caratterizzazione dei parametri chimico fisico principali per la valutazione delle conseguenze sull'ambiente acquatico***

Nell'ottica di fornire un quadro realistico e aggiornato della situazione italiana circa i rischi rappresentati dalle sostanze pericolose per il comparto ambientale, l'attività di analisi e ricerca ha concentrato l'attenzione sulle proprietà chimico fisiche delle sostanze, ritenute significative ai fini della valutazione delle conseguenze per l'ambiente connesse a rilasci accidentali diretti in acque superficiali (sostanze e preparati pericolosi sono stati considerati in condizioni tipiche ambientali: P=1 atm, T=20 °C):

- Solubilità, e cioè l'affinità di una sostanza per il comparto acqua. Valori superiori a 10-2 g/l indicano un'affinità elevata, inferiori a 10-5 g/l che la sostanza è fortemente idrofoba;
- Tensione di vapore o volatilità. Valori superiori ad 1 Pa indicano alta volatilità, inferiori a 10-6 Pa indicano affinità per l'aria molto bassa;
- Coefficiente di ripartizione n-ottanolo/ acqua (Kow). Rappresenta la capacità di una sostanza di essere assorbita nel biota: indica quanto una molecola è affine ai grassi ovvero la sua lipofilità. Se il valore di logKow risulta maggiore di 4,5 allora la sostanza è potenzialmente bioaccumulante. Per i composti organici con logKow minore o uguale di 4,5 l'affinità per lo strato lipidico di un organismo è tale per cui la sostanza non è generalmente considerata bioaccumulante;
- Coefficiente di assorbimento per il carbonio organico, ripartizione fra suolo e acqua (Koc). Log Koc è il coefficiente di adsorbimento al suolo, che determina la quantità di sostanza che rimane fissata al suolo e di conseguenza quella che rimane disponibile per la successiva miscelazione con acqua. Valori di log Koc superiori a 4, in genere, indicano elevata affinità per il suolo.

La ricerca dei valori sopra indicati per le sostanze e preparati pericolosi per l'ambiente individuate, è stata caratterizzata da alcune difficoltà operative: i dati sono risultati di non facile reperimento in letteratura; i valori trovati sono stati caratterizzati da ampi range di variabilità.

In relazione al reperimento dei dati, sono stati presi a riferimento, principalmente, data-base di organismi istituzionali (NIOSH- National Institute for Occupational Safety and Health, ISS - Istituto Superiore di Sanità, etc.) e dei principali produttori e/o esportatori di tali sostanze e preparati pericolosi. Partendo dai numeri identificativi, in particolare, si sono potute univocamente determinare le proprietà ricercate attraverso la consultazione delle schede di sicurezza od anche dei risultati di prove/analisi di laboratorio disponibili in rete.

In merito alla problematica della eccessiva variabilità per alcuni valori dei parametri, va sottolineato che molto spesso in letteratura per una stessa proprietà sono presenti valori che differiscono per più di un ordine di grandezza. Questo è dovuto da un lato alla variabilità delle condizioni sperimentali, dall'altro ai diversi "end points" delle sperimentazioni. Date tali premesse, è stata effettuata una valutazione critica dei dati per arrivare a selezionare quelli più affidabili procedendo alla seguente semplificazione operativa: utilizzo di dati parametrici univoci rappresentativi delle condizioni peggiori in caso di sversamento in acque superficiali di sostanze e preparati pericolosi per l'ambiente (maggiore tendenza a permanere nel corpo idrico superficiale), cercando cioè di assicurare, in maniera quanto meno qualitativa, un vantaggio di sicurezza nello studio del problema. Sulla variabilità dei parametri chemiodinamici, nello specifico, si è operato optando per i valori minimi disponibili per la tensione di vapore, il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/ acqua [Kow] ed il coefficiente di assorbimento per il carbonio organico, ripartizione fra suolo e acqua [Koc]. Di contro, si è operato optando per i valori massimi sui range disponibili per il parametro della solubilità.

### ***2.1 Raggruppamento delle sostanze pericolose mediante analisi dei parametri chimico-fisici***

Al fine di caratterizzare sostanze e preparati pericolosi per l'ambiente individuati (presenti negli stabilimenti a rischio di incidenti rilevanti sul territorio nazionale in quantitativi superiori alle 10 tonnellate), relativamente al comportamento in caso di sversamento in corpi idrici superficiali, si è tentato di schematizzare i due macro-elenchi di prodotti, R50 (compresa R50/53) - 9.i o R51/53 - 9.ii, fornendo una caratterizzazione di tipo quali-quantitativo secondo i valori dei parametri stessi (ad es. bassa - media - alta solubilità, bassa - media - alta volatilità, bassa - media - alta lipofilità, bassa - media - alta affinità per il suolo, etc.).

Le sostanze e i preparati pericolosi per l'ambiente, individuati nelle categorie R50 (compresa R50/53) - 9.i o R51/53 - 9.ii, sono stati successivamente schematizzati in classi, ricalcanti la suddivisione operata nell'ambito dell'analisi dell'esperienza storica di incidenti rilevanti con effetti ambientali riportata nel prosieguo del lavoro (cap. 3.0).

Sono stati innanzitutto individuati i due ambiti principali, idrocarburi e non idrocarburi, identificando in questi ultimi la maggior parte delle sostanze e dei preparati censiti (c.a. 85%). All'ambito idrocarburi, in particolare, fanno capo le seguenti classi: composti aromatici; composti ciclici; idrocarburi liquidi vari; metano/alcani; olio combustibile. Le seguenti classi, invece, si possono identificare nell'ambito non idrocarburi: acidi; alcoli; aldeidi/chetoni; ammidi/eteri/polisaccaridi; ammoniaca; anidridi; cianuri / cianati; cloro / composti; cloruri; detergenti; idrossidi / perossidi; metalli; nitrati; PCB, TCDD; pesticidi / erbicidi; PVC / polimeri; solfati / fosfati / carbonati; solventi / acetone / cloroformio; zolfo / solfuri.

Risultano maggiormente diffusi su territorio nazionale, in termini percentuali, i composti appartenenti alla classe pesticidi/erbicidi, circostanza spiegabile, del resto, con la elevata varietà di sostanze e preparati pericolosi per l'ambiente a tale classe riconducibile. Elevato peso hanno, inoltre, la categoria dei metalli (principalmente zinco, rame, sodio, stagno, nichel e loro derivati), dello zolfo e relativi solfuri (la presenza dello zolfo risulta evidente anche nella macro-classe solfati/fosfati/carbonati), degli acidi e degli alcoli (soprattutto alcoli grassi etossilati). Si evidenzia, infine, nell'ambito dei non idrocarburi, il contributo rappresentato dai preparati afferenti alla sfera del cloro (composti e cloruri).

Tra le sostanze e i preparati pericolosi per l'ambiente, appartenenti alla categoria degli idrocarburi, va messo in risalto il peso percentuale assunto dai composti aromatici (ammine e fenoli) e ciclici, che costituiscono, praticamente, una sorta di micro raggruppamento di riferimento per l'intera categoria.

Incrociando i dati tratti dall'analisi delle proprietà chimico-fisiche con la schematizzazione in classi proposta, si può tentare di fornire una serie di conclusioni di massima circa la fenomenologia dello sversamento, in corpi idrici superficiali, delle sostanze e dei preparati pericolosi per l'ambiente individuati, ferma restando la generale variabilità di comportamenti evidenziata:

- I pesticidi/erbicidi tendono ad avere limitata affinità per il comparto acqua, presentando, per la maggior parte, valori di solubilità oscillanti tra le fasce media - molto bassa. Risultano, inoltre, avere scarsa affinità per l'aria, in quanto appartengono alla fascia di volatilità bassa-trascurabile. Tali preparati, infine, mostrano una media capacità di assorbimento nel biota (lipofilicità) e di affinità per il suolo (con la relativa disponibilità di sostanza per la miscelazione con l'acqua).
- I metalli risultano per la maggior parte insolubili e presentano volatilità per lo più trascurabile. Sono da considerarsi non bioaccumulanti, essendo generalmente caratterizzati da molecole poco affini ai grassi.
- Gli alcoli sono caratterizzati da valori di volatilità medio-bassi (affinità per l'aria), mentre manifestano medio-alta lipofilicità (potenziale bioaccumulante).
- Per il cloro e i suoi composti, come del resto per i cloruri, si rimarca una affinità elevata per il comparto acqua. Si evidenzia, infine, che l'affinità per lo strato lipidico degli organismi è tale per cui, il cloro e i suoi composti, non sono generalmente considerabili bioaccumulanti.
- Nell'ambito degli idrocarburi, si riscontra la generale tendenza dei composti aromatici e ciclici verso valori di solubilità e volatilità medio-bassi. La media tendenza a bioaccumulare di tali composti, infine, ne mostra la possibile capacità di essere assorbiti nel biota.

La caratterizzazione effettuata, tra gli altri, può costituire un utile supporto per le fasi sia di elaborazione che di utilizzo di appositi strumenti di calcolo per le valutazioni connesse ai rilasci di sostanze in matrici idriche superficiali. Al riguardo, le conclusioni della presente linea di attività rappresentano le basi per la prosecuzione della ricerca, al fine di mettere a punto modelli di stima previsionale per lo sversamento di sostanze pericolose per l'ambiente in acque superficiali.

### ***3.0 Analisi dell'esperienza storica di incidenti rilevanti con effetti ambientali***

L'analisi dell'esperienza storica di eventi incidentali con impatto sulle matrici ambientali occorsi in attività industriali, ha confermato l'importanza dell'attività in svolgimento. Sono stati elaborati dati e informazioni tratti dal data-base RNI "Registro Nazionale Incidenti", già denominato BIRD "Banca Dati Incidenti Rilevanti", sistema informatizzato per la raccolta e conservazione delle informazioni sugli eventi incidentali nazionali ed internazionali realizzato da ISPRA.

Mediante tali elaborazioni, è risultato possibile estrapolare elementi di rilievo, utili al fine di caratterizzare ulteriormente la realtà impiantistico gestionale degli stabilimenti a rischio di incidente rilevante presenti sul territorio, con particolare riferimento ai rischi ambientali ad essi connessi.

Sulla scorta di quanto evidenziato, è stato condotto un lavoro di individuazione di una casistica di c.a. 600 incidenti (pari a c.a. il 13% del totale di eventi archiviati nel data-base), per i quali è stata valutata la distribuzione, le cui principali risultanze sono riportate nel prosieguo, secondo parametri, quali: tipologia di attività e stabilimenti

coinvolti; classi di sostanze e preparati interessati; siti e matrici ambientali danneggiati; indagine delle cause scatenanti. Viene inoltre proposto un approfondimento circa la ricognizione di eventi incidentali, coinvolgenti sostanze pericolose per l'ambiente, aventi effetti sulla matrice ambientale acque superficiali, sia di tipo diretto, quali gli sversamenti ed i rilasci accidentali, sia di tipo indiretto, quali gli incendi, a causa, per questi ultimi, dell'utilizzo di acqua e schiume antincendio e conseguente contaminazione degli scarichi idrici.

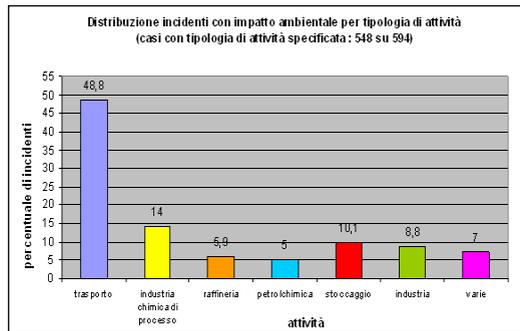


Figura 1. Attività coinvolte

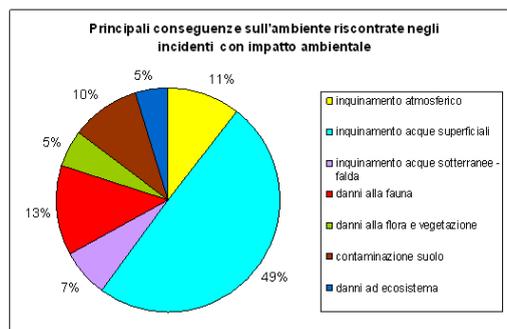


Figura 2. Conseguenze sull'ambiente (componente ambientale)

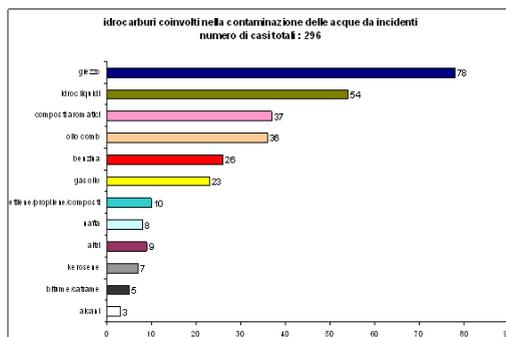


Figura 3. Contaminanti componente ambientale acqua (ambito idrocarburi)

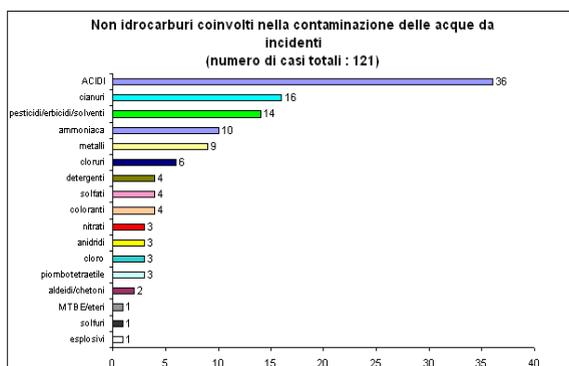


Figura 4. Contaminanti componente ambientale acqua (ambito non-idrocarburi)

Gli incidenti con impatto ambientale risultano associati per lo più a scenari di rilascio/perdita di sostanze chimiche. Si rammenta, al riguardo, che gli effetti ambientali di sversamenti diretti, con specifico riferimento alla matrice idrica superficiale, risultano considerevoli ma più facilmente controllabili. Un contributo apprezzabile è fornito dagli incendi, soprattutto in relazione all'elevato numero di componenti ambientali coinvolte, ivi inclusi i corpi idrici superficiali, e di inquinanti rilasciati, con le relative difficoltà nell'implementazione di sistemi di prevenzione e protezione della matrice ambientale interessata. I consistenti volumi di acqua e schiume antincendio, impiegati per spegnere le fiamme, del resto, rappresentano di per sé una complicazione dello scenario incidentale. Esse offrono, infatti, una volta assolta la propria funzione di protezione antincendio, la possibilità di superare la capacità dei sistemi di contenimento adottati provocando una eventuale contaminazione di acque e corpi idrici superficiali, spesso accompagnata dalla mobilitazione di ulteriori sostanze inquinanti e successiva dispersione, potenziando l'effetto di contaminazione degli habitat acquatici, con effetti ambientali tra i più critici e severi.

In merito agli effetti sulle matrici ambientali si può asserire che, praticamente per tutte le tipologie di scenari analizzate, le componenti maggiormente contaminate in seguito ad eventi incidentali sono riferibili a: ambiente acquatico (per lo più superficiale); territorio (suolo, falde, flora e fauna); atmosfera. Appare evidente che la diversa persistenza ed evoluzione delle sostanze inquinanti rilasciate nelle varie componenti ambientali interessate è direttamente connessa con le proprietà chimico-fisiche ed ecotossicologiche dei preparati pericolosi, oltre che con le caratteristiche del sito colpito.

Le sostanze maggiormente coinvolte sono generalmente idrocarburi liquidi, anche in considerazione della loro diffusione e del loro utilizzo sul territorio nazionale (si rammenta che la maggior parte degli idrocarburi liquidi risulta ricompresa nell'Al.1 parte 1 del D. Lgs. 334/99 e s.m.i., ragion per cui tali sostanze non figurano negli elenchi identificati nei cap. 1.0 e 2.0, inerenti le sostanze e i preparati pericolosi per l'ambiente rientranti nelle categorie 9.i e 9.ii dell'Al.1 parte 2 del decreto stesso). Tra gli idrocarburi più critici per la contaminazione ambientale da incidenti sono da segnalare il grezzo e suoi composti, trend sottolineato in misura ancora più evidente in occasione di rilasci in ambiente acquatico. Le conseguenze ambientali provocate dai derivati del petrolio, sulla scorta, tra gli altri, di esperienze connesse a specifici

eventi di rilevanza nazionale, appaiono tuttavia meno severe, a parità di quantità coinvolte, di quelle create da altre sostanze pericolose per l'ambiente acquatico, verosimilmente per una più frequente migliore gestione dell'emergenza. Tra le sostanze e preparati pericolosi non appartenenti al settore degli idrocarburi più critici per la contaminazione ambientale, ricalcando una tendenza già evidenziata nell'ambito delle analisi condotte circa la diffusione di sostanze pericolose negli stabilimenti nazionali (cap. 2.1), si registrano: cloro e composti; ammoniaca; acidi (tra cui H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl); pesticidi (essenzialmente organoclorurati); altre sostanze clorurate. Altro dato interessante, estrapolabile in termini quantitativi dall'analisi dell'esperienza storica, è fornito dal fatto che rilasci di limitate quantità di alcune sostanze, in determinate circostanze, possono causare gravi danni ambientali. Severi danni alle matrici ambientali, nello specifico, riguardano spesso il coinvolgimento negli eventi incidentali di numerose sostanze non ancora classificate come pericolose per l'ambiente.

Tra le attività principalmente interessate dagli eventi incidentali coinvolgenti matrici ambientali, c'è da registrare il forte peso assunto dal trasporto di merci pericolose, che occupa una posizione predominante tra le attività a rischio. Escludendo gli eventi legati all'attività di trasporto, l'industria chimica e lo stoccaggio sono più frequentemente responsabili di incidenti: industria chimica: produzione-trattamento di pesticidi e produzione di acidi e solventi (spiegabile, del resto, con la elevata varietà di sostanze e preparati pericolosi per l'ambiente a tale classe riconducibile, come visto nel cap. 2.0); stoccaggio: per lo più grezzo e prodotti di raffinazione. Spesso gli eventi incidentali occorsi in attività di stoccaggio, quali l'immagazzinamento di prodotti chimici utilizzati in agricoltura, si pongono all'attenzione per le conseguenze derivanti sui corpi idrici. Strettamente correlata al rilascio di idrocarburi liquidi da attività di trasporto e stoccaggio, del resto, è la forte presenza, tra le tipologie di acque superficiali più colpita, delle reti ed aste fluviali, principali recettori in caso di sversamenti conseguenti ad eventi incidentali riguardanti le citate attività.

L'esame delle cause determinanti i rilasci da eventi incidentali, questi ultimi differenziati nelle due casistiche di interesse (impianti fissi e trasporti), ha permesso di mettere in luce la seguente situazione: per impianti fissi e trasporto: l'urto risulta essere la tipologia più frequente seguita da malfunzionamenti meccanici ed errori umani; per impianti fissi: errori umani e difettosità meccaniche. A tal proposito è evidente la primaria importanza che riveste l'implementazione, da parte dei gestori degli impianti a rischio di incidente rilevante, di un corretto SGS (Sistema di Gestione della Sicurezza) ai sensi del D. Lgs. 334/99 e s.m.i.

#### ***4.0 Conclusioni e linee di indirizzo***

Il lavoro di ricognizione e analisi dell'esperienza storica di eventi incidentali occorsi in stabilimenti industriali a rischio, partendo dalla considerazione degli aspetti caratteristici dello specifico evento, ha dimostrato l'importanza della considerazione degli effetti incidentali sulle matrici ambientali. La valutazione dei danni arrecati all'ambiente ad opera di eventi incidentali occorsi, unita alla capacità previsionale delle conseguenze degli eventi incidentali (analisi di rischio), fornisce utili indicazioni ai fini della pianificazione degli interventi da porre in atto. A tal fine, oltre l'approfondimento tecnico della problematica, si rende necessaria la disponibilità di strumenti di valutazione previsionale dedicati. Da qualche anno ISPRA, nell'ambito delle attività promosse dal Sistema delle Agenzie ambientali territoriali, sta conducendo attività specifiche per la produzione di informazioni tecniche, criteri e metodologie, a supporto dei valutatori delle Autorità pubbliche cui è demandato il compito di analisi e controllo dei rischi di incidente rilevante, ai sensi del D. Lgs. 334/99 e s.m.i., in merito a:

- sostanze coinvolte, cause, componenti ambientali potenzialmente soggette a contaminazione e relativa individuazione dei dati chimico fisici ed eco-tossicologici rilevanti per i diversi inquinanti;
- criteri e modelli utilizzabili per le stime previsionali (qualitativi/quantitativi) delle conseguenze ambientali degli eventi incidentali;
- criteri utili ai fini della individuazione delle misure tecniche per la prevenzione degli incidenti con possibile danno ambientale e della pianificazione della gestione delle emergenze ambientali derivanti da sversamenti incidentali di sostanze pericolose per l'ambiente.

### ***Bibliografia***

<https://www.seveso.sinanet.apat.it/>; <http://www.cdc.gov/niosh/>

<http://esis.jrc.ec.europa.eu/>;

<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>

<http://www.iss.it/basi/index.php?lang=1&tipo=39&anno=2012>

<http://cameochemicals.noaa.gov/>; <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

<http://www.apat.gov.it/site/it->

IT/Servizi\_per\_l'27Ambiente/Prodotti\_fitosanitari/Archivio\_prodotti\_fitosanitari/Guida/

Chemical Hazard Response Information System (CHRIS) – Hazardous Chemical Data Manual (Commandant Instruction M16465.12B), U.S. Department of Transportation – U.S. Coast Guard, Washington, 02/11/1992

The Pesticide Manual – A World Compendium (9th ed.), British Crop Protection Council, Farnham (UK), 1991

Valutazione dell'impatto sull'ambiente degli incidenti rilevanti, APAT, Rapporti 36/2003

# EMERGENZA “EUROCARGO VENEZIA”: STUDIO DEL BIOACCUMULO DI METALLI CRITICI NEL MACROINVERTEBRATO DI FONDI BATIALI *CALOCARIS MACANDREAE*

by L. Morroni<sup>ab</sup>, E. Azzurro<sup>a</sup>, A. Scuderi<sup>a</sup>, A. La Camera<sup>a</sup>, D. Pellegrini<sup>b</sup>

<sup>a</sup> ISPRA, Piazzale dei Marmi 12, 57123 Livorno (Italy) -

david.pellegrini@isprambiente.it

<sup>b</sup> Università Politecnica delle Marche, Via Ranieri, 60128 Ancona (Italy) -

l.morroni@univpm.it

---

**Abstract** - Obiettivo di questo studio è stato quello di indagare i possibili rischi ambientali connessi con la presenza in mare di catalizzatore esausto tossico proveniente dai fusti persi dalla motonave Eurocargo Venezia'. In particolare sono stati determinati i livelli di metalli critici (Ni, Mo, V) nel crostaceo malacostraco *Calocaris macandreae*, un organismo detritivoro presente nell'area interessata dall'incidente. Le analisi sono state condotte su esemplari pescati periodicamente tra il giugno 2012 e l'agosto 2014 (7 campagne) all'interno della zona di rinvenimento dei fusti tossici e in 2 aree di controllo. I risultati non hanno fino ad oggi mostrato differenze significative tra la concentrazione di metalli negli animali raccolti nell'area dei fusti rispetto ai siti di controllo, ed evidenziano un'elevata variabilità naturale nei valori di Molibdeno.

**Keywords:** Emergenza ambientale, Bioaccumulo, *Calocaris macandreae*, Eurocargo Venezia, Metalli

## *Introduzione*

Il 17 dicembre 2011 la motonave Eurocargo Venezia perde in mare due semirimorchi contenenti fusti di catalizzatore esausto utilizzato per la desolforazione del petrolio, contenente alte concentrazioni di nichel, molibdeno e vanadio. Degli oltre 200 fusti dispersi oltre la metà sono stati recuperati con la maggior parte del contenuto. Il seguente studio, condotto dalla sede dell'ISPRA di Livorno, ha l'obiettivo di indagare possibili rischi ambientali connessi con lo smarrimento del suddetto carico. In particolare sono stati determinati i livelli di metalli critici (Nichel, Molibdeno, Vanadio) nel crostaceo malacostraco *Calocaris macandreae*, macroinvertebrato caratteristico degli ambienti batiali e dalle abitudini detritivore (Buchanana 1963; Nash *et al.* 1984, Cartes *et al.* 1994).

## *Materiali e metodi*

I campionamenti sono stati realizzati nel corso di 7 campagne di pesca scientifica, condotte tra il giugno 2012 e l'agosto 2014, in corrispondenza della zona di ritrovamento dei fusti e in 2 aree di controllo (Fig. 1). Come ulteriore area di controllo, sono stati inclusi campioni provenienti dal Mar Catalano. La cattura degli esemplari è

stata effettuata tramite una draga sperimentale tipo Agassiz appositamente realizzata da ISPRA e adatta al campionamento di organismi bentonici su aree spazialmente limitate. Indagini preliminari sulle comunità bentoniche hanno permesso di identificare il crostaceo *Calocaris macandreae* come specie target per le analisi di bioaccumulo di metalli critici per le sue abitudini alimentari e per la sua abbondanza nei siti di indagine.

Il contenuto di Ni, V e Mo nei tessuti di *C. macandreae* è stato analizzato tramite AAS e ICP con la metodologia indicata da ICRAM [2001] adattata ai parametri selezionati. I livelli univariati e multivariati dei livelli di contaminanti sono stati confrontati statisticamente tramite il pacchetto software PRIMER+Permanova (PRIMER-E Ltd)

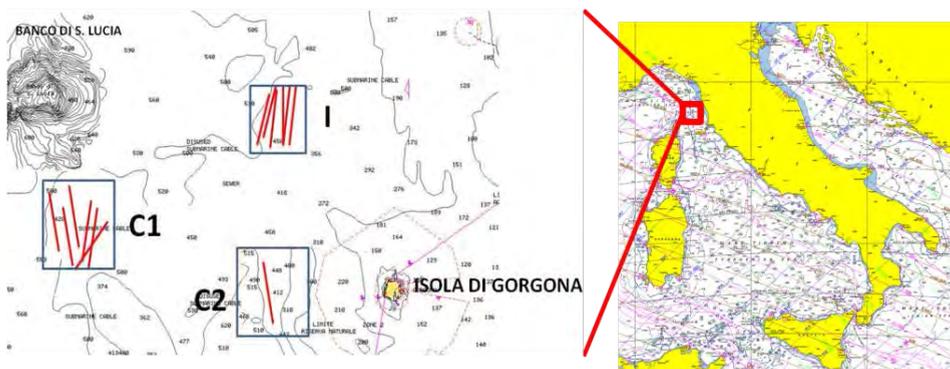


Figura 1. Mappa dell'area indagata: I = area di rinvenimento fusti, C1 e C2 = aree di controllo. In rosso vengono riportate le singole cale

## Risultati

I risultati dell'analisi PERMANOVA evidenziano differenze significative per il fattore 'Area' ( $p = 0.047$ ; confronto tra tutte le aree indagate) ma non per il fattore 'Impatto' (confronto area impattata/aree di controllo). Nel dettaglio Ni e V mostrano valori comparabili nelle aree di controllo rispetto a quella di possibile impatto (Fig. 2 B,D). I valori (Ni: 9 mg/kg s.s.; V: 10 mg/kg s.s.) rilevati nell'area di controllo C1 duante la campagna del 17/5/2012 (Tabella 1) risultano più alti dei valori massimi riscontrati nell'area di rinvenimento fusti. Il Mo, generalmente presente in concentrazioni inferiori rispetto agli altri metalli, mostra valori particolarmente bassi nell'area C2 e nel Mar Catalano (Fig.2 C).

Tabella 1: Valori di Ni, Mo V (mg/kg) per ogni unità di campionamento ('cala')

Area	Cala	Ni (mg/kg)	Mo (mg/kg)	V (mg/kg)	
I	I1A1 (17/5/12)	6	1	4,2	
	I2A1 (17/5/12)	5	0,9	5,7	
	IA (1/8/12)	3	0,63	3,7	
	IB (1/8/12)	4	0,7	3	
	IA (13/12/12)	4,13	0,26	5,41	
	IA (19/6/13)	3,73	1,12	3,87	
	IA (6/9/13)	3,88	0,08	5,05	
	IA (13/12/13)	3,44	0,66	4,77	
	IA1 (13/12/13)	3,74	0,08	5,07	
C1	C1 (17/5/12)	9	0,84	10	
	CA (1/8/12)	2,6	0,46	3	
	CA (13/12/12)	3,38	0,87	3,87	
	CA (19/6/13)	4,35	0,11	5,12	
	CA (6/9/13)	2,85	0,82	3,65	
	CA (13/12/13)	3,89	0,19	4,79	
	CA2 (13/12/13)	3,25	0,7	4,38	
	CA2 BIS (13/12/13)	3,08	1,54	4,08	
C2	CC (19/6/13)		5,26	0,11	6,97
MAR CATALANO			2,48	0,09	3,83



## ***Bibliografia***

Buchanana JB 1963. The biology of *Calocaris macandreae* [Crustacea: Thalassinidea]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 43(03): 729-747.

Cartes JE, Sorbeb CJ, Sardàa F. 1994. Spatial distribution of deep-sea decapods and euphausiids near the bottom in the northwestern Mediterranean. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 179(5): 131-144

ICRAM. 2001. Metodologie analitiche di riferimento - programma di monitoraggio per l'ambiente marino costiero (triennio 2001- 2003) - Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio.

Nash RDM, Chapman CJ, Atkinson RJA, Morgan PJ. 1984. Observations on the burrows and burrowing behaviour of *Calocaris macandreae* [Crustacea: Decapoda: Thalassinidea]. Journal of Zoology 202 (3): 425-439.

# SAGGIO DI EMBRIOTOSSICITÀ *IN SITU* PER LA VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ AMBIENTALE DI ACQUE MARINE COSTIERE: RISULTATI PRELIMINARI CON IL RICCIO DI MARE *PARACENTROTUS LIVIDUS*

di L. Morroni<sup>ab</sup>, D. Sartori<sup>a</sup>, S. Giuliani<sup>a</sup>, D. Pellegrini<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Università Politecnica delle Marche, Via Ranieri, 60128 Ancona (Italy) - l.morroni@univpm.it

<sup>b</sup> ISFRA, Piazzale dei Marmi 12, 57123 Livorno (Italy) - david.pellegrini@isprambiente.it

---

**Abstract** - L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di indagare l'applicabilità *in situ* del saggio di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus*. Il protocollo metodologico "in laboratorio" è stata in parte adattato alle condizioni di campo e sono state appositamente realizzate camere d'esposizione per consentire l'incubazione degli embrioni nella colonna d'acqua. Queste sono state posizionate in 3 differenti siti, dove sono stati condotti in parallelo test di embriotossicità *in situ* e in condizioni controllate di laboratorio. I risultati hanno evidenziato percentuali di embrioni normoformati in media inferiori nelle prove *in situ* rispetto alle prove condotte in laboratorio, ad eccezione del sito di controllo in cui non sono state rilevate differenze significative. I test *in situ* si presentano quindi come buoni candidati per la valutazione diretta di criticità ambientali.

Keywords: saggi in situ, saggi biologici, *Paracentrotus lividus*, embriotossicità, biomonitoraggio

## **Introduzione**

I saggi biologici vengono frequentemente utilizzati per la valutazione della qualità ambientale delle acque marine. Tuttavia il classico approccio di laboratorio è stato spesso criticato in quanto le condizioni controllate a cui avviene il test possono non rispecchiare quelle realmente presenti nell'ambiente indagato (Cairns *et al.* 1983). In questo contesto i saggi biologici *in situ* si propongono come buoni candidati per consentire una realistica interpretazione degli effetti della contaminazione nei confronti del biota in quanto in grado di integrare nel tempo gli effetti della presenza di eventuali tossici e delle loro interazioni con i fattori ambientali (Rosen *et al.* 2009). L'obiettivo del presente lavoro è quello di adattare il protocollo del saggio di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* alle condizioni *in situ* per consentire una valutazione della tossicità di acque marine.

## **Materiali e metodi**

Adulti di *P.lividus* sono stati campionati in un sito localizzato a sud di Livorno in un'area lontana da evidenti fonti di contaminazione. Successivamente sono stati traspostati in laboratorio e acclimatati in condizioni controllate per almeno una settimana. Il saggio di embriotossicità è stato condotto a partire da procedura

standard (ASTM 2004; USEPA 1994, 1995, 2000) e studi di letteratura (Arizzi Novelli *et al.* 2002; Volpi Ghirardini *et al.* 2005, Carballeira *et al.* 2012).

Per consentire l'incubazione *in situ* degli embrioni sono state realizzate speciali camere d'esposizione. In particolare su un supporto rigido sono state fissate 3 camere in polipropilene del volume di 50 ml con un'apertura dotata di rete di nylon con maglia di 50  $\mu\text{m}$ , in modo da consentire il ricambio d'acqua impedendo la fuoriuscita degli embrioni. Le camere sono state collegate a un peso e una boa, per essere posizionate in 3 stazioni situate lungo la costa meridionale di Livorno (Figura 1). S1 (43 ° 31'1 .87 "N, 10 ° 18'57 .70" E) è localizzata in una zona antropizzata all'interno del porticciolo di Ardenza. Le stazioni S2 (43 ° 27'40 .02 "N, 10 ° 21'36 .32" E) e S3 (43 ° 25'37 .10 "N, 10 ° 23'48 .27" E) si trovano invece più a sud in zone scarsamente antropizzate ed S3 è anche il sito di prelievo degli organismi test e dell'acqua di mare utilizzata per condurre il saggio.

Il test è stato eseguito in parallelo *in situ* ed in laboratorio esponendo gli embrioni ai campioni d'acqua prelevati in campo in 4 date diverse. In laboratorio, oltre ad un controllo negativo con acqua di mare filtrata a 0,45  $\mu\text{m}$  è stato allestito anche un controllo positivo con nitrato di rame, con i medesimi gameti utilizzati in campo, al fine di verificare un possibile stress legato al trasporto. Sono stati inoltre registrati i parametri chimico-fisici della colonna d'acqua e determinata la presenza di IPA e metalli in tracce.

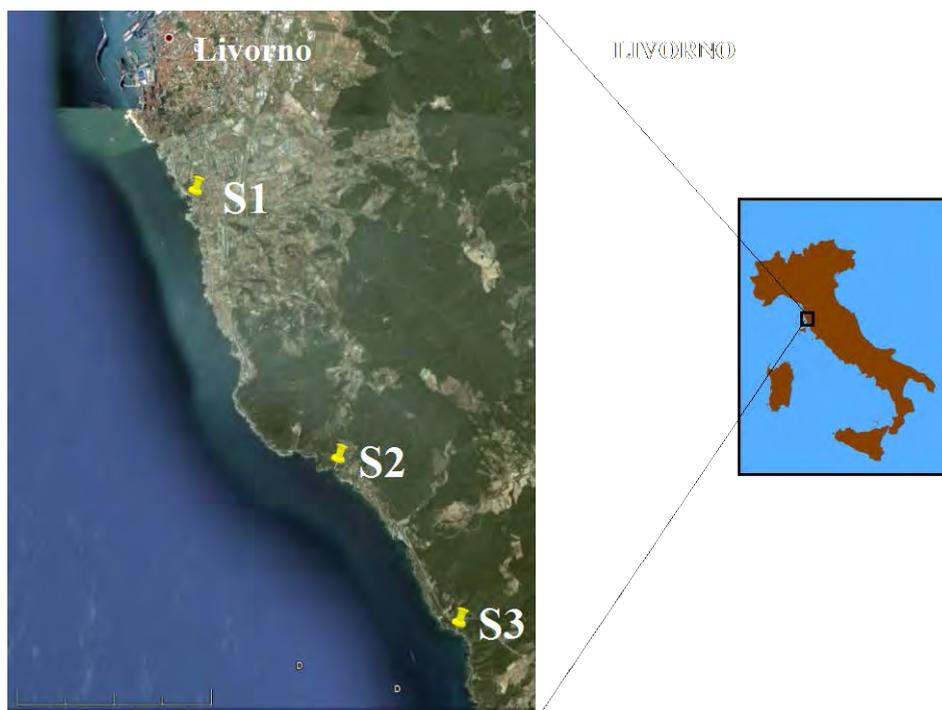


Figura 1. Area di studio: S1 = Stazione 1, S2 = Stazione 2, S3 = Stazione 3 de sito di riferiment.

## Risultati

I risultati dei saggi condotti in laboratorio hanno mostrato un'assenza di effetti sullo sviluppo, con valori di plutei normoformati attorno all'80% e senza differenze significative con il controllo di laboratorio (Figura 2). Per quanto riguarda invece i saggi *in situ* hanno mostrato valori significativamente più bassi rispetto quelli di laboratorio nelle stazioni S1 e S2, mentre non sono state rilevate differenze significative nel sito di riferimento S3. Le EC50 stimate nei controlli positivi non hanno evidenziato variazioni e rientrano nella carta di controllo di laboratorio e sono confrontabili con i dati di letteratura [Arizzi Novelli *et al.* 2003] (Figura 3). Per quanto riguarda le analisi chimiche e chimico-fisiche non sono state evidenziate variazioni dei parametri selezionati.

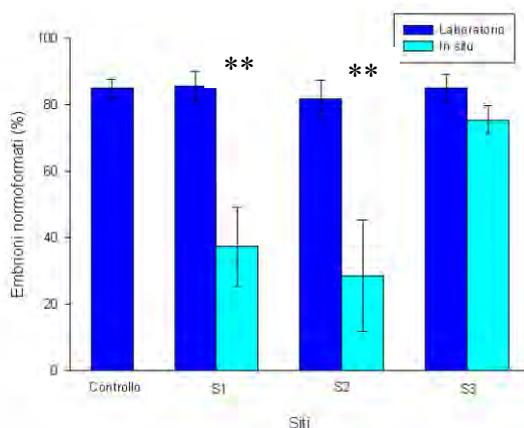


Figura 2. Percentuale media di embrioni normoformati ( $\pm ES$ ) in condizioni di laboratorio e in situ. Gli asterischi indicano differenze significative ( $*P < 0,01$ ) e molto significative ( $P^{**} < 0,05$ ) tra saggio in situ e in laboratorio.

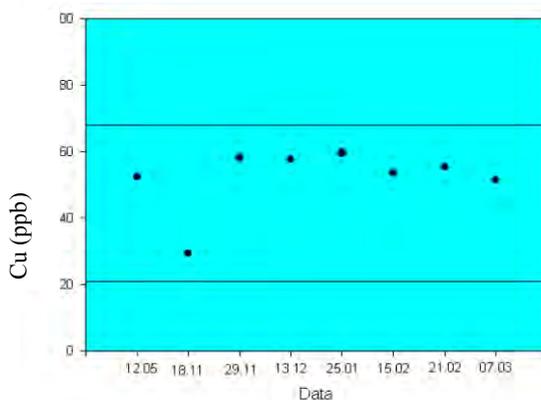


Figura 3. Carta di controllo di laboratorio: i punti rappresentano le EC50 di embrioni derivanti da gameti trasportati ed esposti a nitrato di rame.

## **Discussione**

I risultati hanno evidenziato percentuali di embrioni normoformati in media inferiori nelle prove *in situ* rispetto alle prove condotte in laboratorio in S1 e S2, mentre in S3 sono state rilevate differenze significative. Vista anche l'assenza di disturbo dovuto al trasporto dei gameti è ragionevole supporre si siano verificati eventi di stress in S1 ed S2 durante il periodo d'esposizione e non rivelati dal test condotto in laboratorio. Le due stazioni, essendo quelle situate in zone maggiormente antropizzate risultano essere probabilmente anche quelle soggette ad una maggiore variabilità riguardo una possibile contaminazione della colonna d'acqua.

## **Conclusioni**

Alla luce dei risultati ottenuti con il presente studio, volti ad evidenziare una più realistica valutazione della qualità della colonna d'acqua in un dato periodo della prova *in situ* rispetto a quella di laboratorio, si ritiene opportuno condurre ulteriori prove di approfondimento. In particolare risulta necessario aumentare la frequenza dei prelievi in campo, cercando anche di avere maggiori riscontri sulla presenza di una reale contaminazione o l'influenza di possibili *confounding factors*.

Ad ogni modo i risultati preliminari appaiono incoraggianti per un futuro utilizzo del saggio di embriotossicità *in situ* con embrioni di riccio di mare.

## **Bibliografia**

- Arizzi Novelli, A., Argese, E., Tagliapietra, D., Bettiol, C., Volpi Ghirardini. 2002. Toxicity of tributyltin and triphenyltin toward the early life stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinodea). *Env. Toxicol. Chem.* 21(4):859-864.
- Arizzi Novelli A, Losso C., Ghetti P.F, Volpi Ghirardini. 2003. Toxicity of heavy metals using sperm and embryo toxicity bioassay with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinodea): comparison with exposure concentrations in the lagoon of Venice, Italy.. *Env. Toxicol. Chem.* 22(6): 1295-1301.
- ASTM E1563-04. 2004. Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. In: *Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphia, PA 11(05):1029-1046
- Cairns, J. 1983. Are single-species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia*, 100: 47-57.
- Carballeira, C, Ramos-Gómez J, Martín-Díaz L, DelValls TA. 2012. Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents. *Marine Environmental Research* 77(2012): 12-22.
- Rosen G, Chadwick DB, Poucher S, Greenberg MS, Burton GA. 2009. *In Situ Estuarine and Marine Toxicity Testing: A Review, Including Recommendations for Future Use in Ecological Risk Assessment*. Technical Report 1986, September 2009. SSC Pacific, San Diego, CA, USA.
- USEPA. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Klemm, D.J., Morrison, G.E., Norberg-Ring, J.J., Peltier, W.H., Herber, M.A., U.S. Environmental Protection Agency. Report EPA-600-4-91/003, Cincinnati, OH 483.
- USEPA. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA/600/R-95/136, Cincinnati, OH, U.S.

USEPA. 2000. Estuarine and coastal marine waters: bioassessment and biocriteria technical guidance. USEPA-Office of Water EPA-822-B-00-024 385.

Volpi Ghirardini, A., Arizzi Novelli, A., Tagliapietra, D. 2005. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environment International* 31:1065-1077.

## CON IL PATROCINIO DI

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

Presidenza del Consiglio dei Ministri –Dipartimento della Protezione Civile

Comune di Livorno

ARPA Toscana

ARPA Veneto

ARPA Piemonte

ARPA Marche

CNR- ISMAR

CNR-ISE

CNR-IBIM

Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli

Università di Parma

Università di Ferrara

Università Ca' Foscari (Venezia) Università di Genova

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente - Università Politecnica delle Marche

Dipartimento di Scienze Fisiche, della Terra e Ambientali – Università di Siena

Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico I

Società Italiana di Biologia Marina (SIBM)

Society of Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC Italian Branch



Evento organizzato da:



Con il contributo di:



Con la collaborazione di: **tecnoEdizioni**

Con il supporto di: **cibm**