

**RICERCA E APPLICAZIONE DI METODOLOGIE  
ECOTOSSICOLOGICHE IN AMBIENTI ACQUATICI  
E MATRICI CONTAMINATE**



# ATTI

delle Giornate di Studio su:

**L'ECOTOSSICOLOGIA COME STRUMENTO DI GESTIONE**

La ricerca, il controllo da parte delle Agenzie, il mondo dei privati

**7a EDIZIONE**

**GIORNATE DI STUDIO  
22-24 NOVEMBRE 2016**

*7th Biannual ECotoxicology MEeting (BECOME 2016)*



MUSEO DI STORIA NATURALE  
DEL MEDITERRANEO DI LIVORNO

Villa Henderson - Centro Congressi  
Via Roma, 234 - Livorno



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

**Giornate di Studio - 7<sup>a</sup> edizione**

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

**La ricerca, il controllo da parte delle Agenzie.  
Il mondo dei privati**

**ATTI**

**Livorno, 22-24 novembre 2016**

### **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 2016  
ISBN 978-88-448-0821-1

Riproduzione autorizzata citando la fonte

### **Elaborazione grafica**

ISPRA

*Grafica di copertina:* Sonia Poponessi

*Foto di copertina:* Marco Faimali

### **Coordinamento editoriale:**

Daria Mazzella

**ISPRA** – Area Comunicazione - DG-COM

MAGGIO 2017

**A cura di:**

Cristian Mugnai (CN - COS)

**Con la revisione di:**

David Pellegrini (CN - COS)

## INDICE

---

PREMESSA .....	6
Test di fitotossicità su acque di diversa tipologia contenenti arsenico .....	7
Effetto tossico di nanoparticelle di ZnO sulle comunità microbiche del suolo e sulle piante. ....	13
Progetto di Tutela del gambero di acqua dolce in Alto Adige: esempio di applicazione di test di fitotossicità .....	22
L'ecotossicologia nella gestione della balneabilità delle acque .....	31
Valutazione degli effetti della disinfezione con acido peracetico sulle acque di scarico urbane .....	37
Applicazione di una batteria di test tossicologici per la valutazione di sedimenti fluviali del SIR Saline Alento .....	42
Effetti della caffeina sullo sviluppo embrionale di zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) .....	48
Valutazione ecotossicologica di un ambiente marino-costiero: caso studio .....	54
Antioxidant responses of <i>Chamelea gallina</i> to environmental changes in Porto Levante (Rovigo, Italy) .....	60
Characterization of cholinesterases in the polychaete <i>Diopatra neapolitana</i> . ....	69
Ecotoxicity of ketoprofen and the S(+)-enantiomer (dexketoprofen): bioassays in freshwater model species and responses of fish PLHC-1 cell-line .....	76
Towards a summary of ecotoxicological knowledge regarding the Mediterranean <i>Ostreopsis cf. ovata</i> .....	83
Acute and short-term toxicity of 12 additives for mechanized tunneling.....	88

Old molecules, new challenges: acute and short-term aquatic toxicity of textile dyes .....	94
PBT: un nuovo strumento per lo screening delle sostanze. ....	100
Implementazione di una strategia di indagine integrata per l'identificazione delle cause di stress negli ambienti acquatici. ..	106
Personal care products and microplastics contamination in aquatic environments: preliminary results of a survey on exfoliants .....	113
Il ruolo dell'ecotossicologia nell'allegato tecnico al DM 173/2016 .....	118

# PREMESSA

---

La 7a edizione delle Giornate di Studio “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche: L’ecotossicologia come strumento di gestione degli ambienti acquatici e terrestri”, si è svolta a Livorno presso il Museo di Storia Naturale del Mediterraneo, Centro Congressi Villa Henderson, dal 22 al 24 novembre 2016.

L’iniziativa ha riscosso un notevole successo, registrando una affluenza di oltre 200 partecipanti (con una grande rappresentanza di giovani) e con la presentazione di 40 comunicazioni scientifiche e 35 poster.

Gli argomenti trattati nelle varie sessioni hanno considerato: bioconcentrazione, bioaccumulo e bioindicatori; l’ecotossicologia nella gestione ambientale; contaminanti emergenti (nanomateriali, prodotti farmaceutici, plastiche ecc); nuove frontiere nell’indagine ecotossicologica; l’ecotossicologia nell’analisi del rischio ecologico; l’ecotossicologia nelle normative nazionali e internazionali e nello sviluppo di processi industriali.

Rispetto alle edizioni precedenti, è stato dato un maggiore spazio alla discussione, sia attraverso la formulazione di domande a cura dei moderatori e del pubblico al termine di ogni comunicazione, sia attraverso il coinvolgimento di “osservatori qualificati” in grado di evidenziare punti di forza e criticità al termine di ogni sessione. Inoltre, è stata facilitata la partecipazione attiva anche di chi ha difficoltà a intervenire in plenaria attraverso lo svolgimento di focus group in tavoli separati, approfondendo alcuni aspetti emersi nelle sessioni grazie alla metodologia del pro-action café : un gruppo ha approfondito gli aspetti legati alle soluzioni tecniche e metodologiche per le prove ecotossicologiche, un altro il loro trasferimento a livello normativo e infine un gruppo ha avanzato proposte su una implementazione del networking, ovvero circolazione e condivisione delle informazioni.

A conclusione delle giornate di studio si è svolto il workshop internazionale “Nanotecnologie sicure per l’ambiente: stato dell’arte, prospettive future e valutazione ecotossicologica della nanoremediation per la bonifica di suoli e sedimenti contaminati”, che ha visto la partecipazione di rappresentanti di imprese locali e esperti internazionali nel campo delle nanotecnologie per la bonifica di suoli e acquiferi contaminati.

Infine, nella sala poster, in parallelo alle giornate di studio, è stata allestita una piccola mostra fotografica, a cura della Dott.ssa Silvia Giuliani (ISPRA) dedicata alla presenza di plastiche nell’ambiente marino, argomento di interesse ambientale emergente.

Di seguito si riportano i contributi tecnico scientifici i cui autori hanno autorizzato la pubblicazione come ATTI della 7ª edizione delle Giornate di Studio “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate”.

David Pellegrini e Cristian Mugnai

# TEST DI FITOTOSSICITÀ SU ACQUE DI DIVERSA TIPOLOGIA CONTENENTI ARSENICO

by N. Guerrieri <sup>a</sup>, L. Cavalca <sup>b</sup>, A. Corsini <sup>b</sup>, L. Scaglioni <sup>b</sup>

<sup>a</sup> CNR-ISE Istituto per lo Studio degli Ecosistemi - Largo Tonolli n.50,28922-Verbania, [n.guerrieri@ise.cnr.it](mailto:n.guerrieri@ise.cnr.it)

<sup>b</sup> DeFENS-Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Milano – via Celoria n.2, 20133-Milano, [lucia.cavalca@unimi.it](mailto:lucia.cavalca@unimi.it), [anna.corsini@unimi.it](mailto:anna.corsini@unimi.it), [leonardo.scaglioni@unimi.it](mailto:leonardo.scaglioni@unimi.it)

---

**Abstract** -. Il test di fitossicità è stato utilizzato per monitorare acque contenenti arsenico. All'interno del progetto BATA (Bacterial-assisted Adsorption Technology for Arsenic removal from water-CARIPLO) sono stati analizzati 15 diversi campioni di acque: 6 acque di falda in Lombardia, 5 acque di falda e 3 acque geotermali nel Viterbese e le acque del Lago di Vico. Le acque sono state testate mediante test di germinazione e allungamento radicale, metodo UNI CHIM 1651:2003. Sono stati utilizzati semi di crescione (*Lepidium sativum*), cetriolo (*Curcumis sativus*) e sorgo (*Sorghum saccharatum*), in nessuna acqua testata si evidenzia marcata inibizione, il crescione ha mostrato una evidente biostimolazione in diversi campioni.

E' stato monitorato, anche il torrente Rio Rosso in Valle Anzasca (Piemonte). Le acque arsenico ferruginose di questo sito sono state monitorate dal 2013 al 2016 con il crescione, più sensibile alla presenza di arsenico. Si è evidenziata una biostimolazione variabile nel tempo, in relazione alla composizione delle acque e alle variabili climatiche. Come controllo positivo è stato utilizzato l'arseniato bibasico di sodio. Il test ha mostrato come lo stress dovuto alla presenza di arsenico, alle concentrazioni presenti nelle acque, possa indurre una stimolazione dello sviluppo, che dovrebbe essere approfondita, per una migliore valutazione della qualità delle acque.

Keywords: Arsenico, *Lepidium sativum*, *Curcumis sativus*, *Sorghum saccharatum*, test fitotossicità.

## Introduzione

Il test di fitotossicità è largamente utilizzato insieme ad altre batterie di saggi in ecotossicologia per il controllo delle acque e dei sedimenti. In questo lavoro abbiamo utilizzato il test di fitotossicità per studiare lo sviluppo dei semi in presenza di acque di falda, geotermali e di superficie contenenti elevate quantità di metalli, allo scopo di verificare le potenzialità del saggio e prevedere lo sviluppo di altri metodi da affiancare al test per renderlo più sensibile. La capacità del mondo vegetale di adattarsi e attivare sistemi di difesa contro molecole potenzialmente tossiche potrebbe

essere approfondita per sviluppare nuovi metodi per monitorare l'ambiente acquatico.

### **Materiali e metodi**

-Sono state monitorate acque contenenti arsenico mediante test di germinazione e allungamento radicale secondo il metodo UNICHIM 1651:2003.

-Le acque analizzate, all'interno del progetto BATA, provenivano da campionamenti effettuati nel 2015. Sono stati utilizzati 15 diversi campioni di acque. 6 acque di falda in Lombardia: Lodi (LO), Pontevico (BS), Redonesco (MN), Somma Lombardo (VA), Paderno Ponchielli (CR1), Pescarolo e Uniti (CR2). 5 acque di falda nel Viterbese: pozzo mobilificio (MOB), fontanile (FON), pozzo Belfiore (BEL), pozzo Sant'Angelo (ANG), pozzo olive (OLI). 3 acque geotermali nel viterbese: San Sisto (SSC), Palliano (PAL), Carletti (CAR). Le acque del Lago di Vico (VICO).

- Sono state analizzate anche le acque del torrente Rio Rosso in Valle Anzasca, Piemonte. le acque termali fredde arsenico-ferruginose di questo sito sono state monitorate dal 2013 al 2015 utilizzando test di fitotossicità con il *Lepidium sativum*.

- Come controllo è stata utilizzata l'acqua Milli Q, come indicato nella metodica. Come controllo positivo con i semi di *Lepidium sativum* è stato utilizzato l'arseniato bibasico di sodio (As V).

### **Risultati**

- La quantificazione dello spettro ionico delle acque testate mostra una elevata quantità di arsenico e altri metalli, in particolare il sito CR2 ha un'elevata quantità di arsenico seguito da BS, in parte come As (III) (Fig. 1). Queste elevate concentrazioni però non inibiscono i germogli studiati. Le acque lombarde mostrano invece una stimolazione con il *creoscione*, il sorgo mostra una stimolazione significativa per due siti (MN e LO). Non si evidenzia una marcata inibizione, tranne per il cetriolo tutti i siti tranne uno (VA) (Tabella 1).

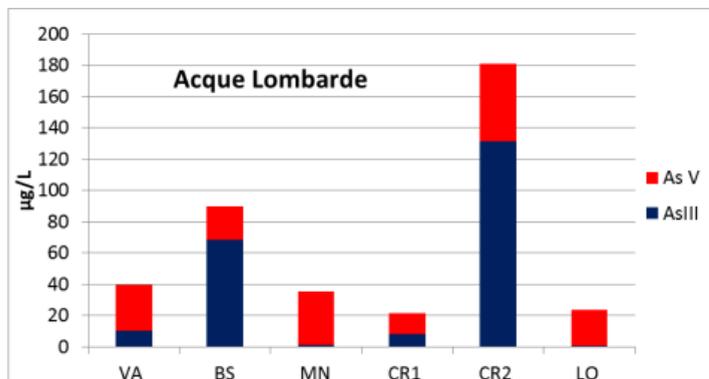


Fig. 1 Arsenico: speciazione nelle acque Lombarde

Tabella 1

	crescione	cetriolo	sorgo radici	sorgo germoglio
	IG %	IG %	IG %	IG %
Controllo	100.00	100.00	100.0	100.0
CR1	134.61	80.27	97.9	115.9
CR2	121.77	81.04	97.0	105.2
MN	136.43	77.49	128.7	144.8
LO	142.96	84.81	110.0	119.7
VA	151.86	109.41	117.9	119.4
BS	146.22	86.95	102.0	109.9

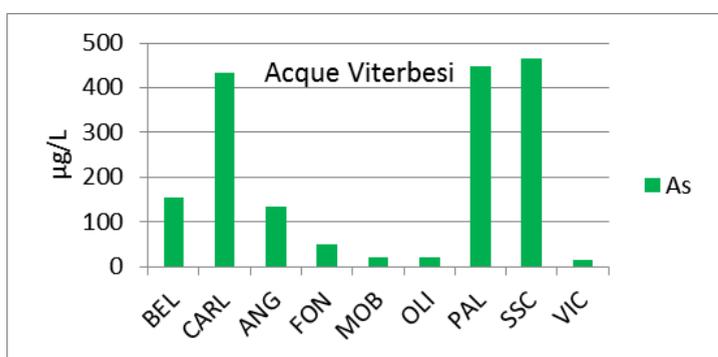


Fig. 2 Contenuto in arsenico nelle acque Viterbesi

Tabella 2

	crescione	cetriolo	sorgo radice	sorgo germoglio
	IG%	IG%	IG%	IG%
Controllo	100.0	100.0	100.0	100.0
MOB	130.6	116.6	86.1	130.8
FON	150.8	121.7	109.6	118.3
SSC	124.0	88.6	83.2	146.7
OLI	137.4	79.6	66.1	118.3
PAL	128.1	95.5	107.4	119.5
CAR	129.4	88.6	83.2	63.9
BEL	148.9	141.5	63.5	89.9
ANG	172.7	118.3	76.5	113.0
VICO	141.3	112.9	86.4	99.4

Le acque del Viterbese presentano uno spettro ionico ancora più marcato e un contenuto in arsenico ancora più elevato, alcune sono anche geotermali, le quantità di arsenico sono riportate in figura (Fig. 2). Il test di fitotossicità mostra anche in questi campioni una stimolazione per i

germogli di *lepidium sativum*. (crescione) molto evidente. In alcuni campioni di sorgo germoglio (MOB, SSC) e in un campione di cetriolo (BEL) si evidenzia stimolazione, mentre una piccola inibizione si rileva solo nel sorgo radice (BEL, OLI) e in un campione sorgo germoglio (CAR) (Tabella 2).

- Le acque arsenico ferruginose del Rio Rosso sono ricche in metalli e arsenico, come mostrato in Fig. 3 ma non inibiscono la crescita del *Lepidium sativum*, anzi si osserva sempre una piccola stimolazione, con un valore medio di IG % di 122 su una media di 19 campionamenti effettuati tra il 2013 e il 2015 in diverse stagioni.

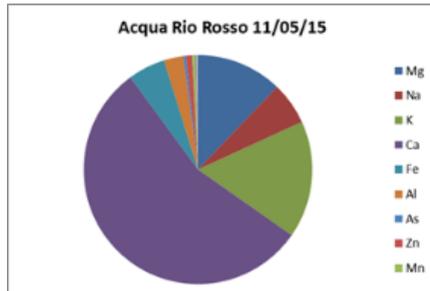


Fig. 3 Principali elementi chimici presenti nelle acque del Rio Rosso (11 maggio 2015)

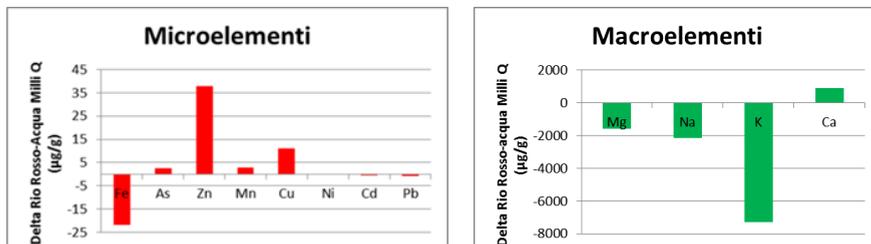


Fig. 4 Macroelementi e microelementi presenti nei germogli di *Lepidium sativum*. Delta  $\mu\text{g/g}$  s.s.: elementi presenti nei germogli cresciuti con acqua del Rio Rosso (11 maggio 2015) a cui si sono sottratti gli elementi presenti nel test di riferimento con acqua Milli Q.

Analizzando i metalli contenuti nei germogli ed esprimendoli come differenza tra Rio Rosso e acqua Milli Q (Fig. 4), si nota un'elevata perdita di potassio (K), una piccola perdita di magnesio (Mg) e sodio (Na), un assorbimento di calcio (Ca) tra i macroelementi presente in elevate quantità nelle acque testate. Tra i microelementi una perdita di ferro (Fe) pur essendo presente in larghe quantità nell'acqua del Rio Rosso (Fig. 3), un assorbimento di zinco (Zn), rame (Cu), arsenico (As) e manganese (Mn).

Il test di fitotossicità è stato applicato anche in sistema modello con quantità note di arseniato bibasico di sodio, per identificare l'effetto sui semi di crescita di un singolo elemento in quantità crescenti. Germogli di crescita cresciuti in presenza di quantità crescenti di arsenico (V) (arseniato bibasico di sodio) mostrano una piccola tendenza alla

stimolazione a basse concentrazioni (0.4 mg/ml) e una marcata inibizione ad elevate concentrazioni (100 mg/ml). L'inibizione nello sviluppo radicale è evidente, e molto più pronunciata dello sviluppo del germoglio, a concentrazioni superiori a 6.5 mg/ml, idati sono riportati in Fig. 5. Nei germogli si accumula arsenico.

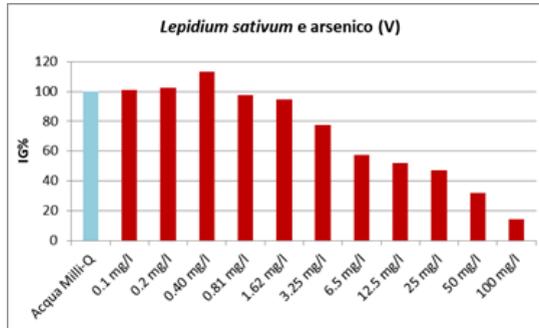


Fig.5 IG% *Lepidium sativum* con quantità crescenti di arsenico

### Discussione

Il test di fitotossicità nei campioni studiati, acque Lombarde, Viterbesi e Rio Rosso mostra, in particolare per il *Lepidium sativum*, una evidente stimolazione, *Curcumis sativum* e *Sorghum saccharatum* mostrano andamenti complessi che devono essere ulteriormente approfonditi. Nonostante il particolare spettro ionico dei campioni, non si rilevano inibizioni molto marcate ma al contrario si evidenzia una tendenza alla stimolazione della crescita.

Il confronto con sistemi modello con *Lepidium sativum* ha confermato, nell'intervallo studiato, una spiccata stimolazione che viene persa solo per quantità molto elevate di quelle riscontrate naturalmente nelle acque, anche geotermali. La stimolazione è comunque imputabile ad uno stato di stress, come si nota dal contenuto in metallo dei semi di *Lepidium sativum* stimolati dalle acque del Rio Rosso.

### Conclusioni

Per riuscire a comprendere gli effetti dei metalli sugli organismi vegetali ed in particolare sullo sviluppo dei germogli nel test di fitotossicità è necessario studiare anche le relazioni esistenti tra la risposta allo stress ossidativo indotto dai metalli (Baran et al., 2014) e la stimolazione (o l'inibizione) alla crescita, analizzando anche altri indicatori molecolari, quali le attività enzimatiche, da associare al test (Sarvajeet et al., 2012), per ottenere indicatori per la valutazione della qualità delle acque più sensibili.

### Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare il supporto della Fondazione CARIPLO con il progetto 2014-1301.

## ***Bibliografia***

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.

Baran A, Czech Tomasz, Wieczorek J. 2014. Chemical properties and toxicity of soils contaminated by mining activity. *Ecotoxicology* 23: 1234–1244.

Sarvajeet S G, Nafees A K, Narendra T. 2012. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Science* 182: 112– 120.

# EFFETTO TOSSICO DI NANOPARTICELLE DI ZNO SULLE COMUNITÀ MICROBICHE DEL SUOLO E SULLE PIANTE

by P. Casella<sup>a</sup>, M. Oliviero<sup>a,b</sup>, S. Schiavo<sup>a</sup> and S. Manzo<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Università degli Studi di Napoli "Parthenope"

---

**Abstract**– Le nanoparticelle ingegnerizzate a base di metalli vengono inevitabilmente disperse nell'ambiente. Nell'ecosistema terrestre, possono interagire con la matrice suolo e con gli organismi causando diversi effetti avversi. Nel nostro lavoro abbiamo studiato gli effetti dell'esposizione, a due diverse concentrazioni di zinco nanoparticolato, non nanoparticolato e ionico mediante un approccio combinato tra metodi ecotossicologici ed analisi sull'attività microbica, focalizzando l'attenzione su due modalità di dispersione: wet e dry. Un generale effetto inibitorio è stato evidenziato sulla respirazione e sull'attività enzimatica della comunità microbica. In particolare i maggiori effetti sono stati osservati per la modalità di dispersione wet, con una riduzione dell'attività respiratoria tra il 50% ed il 70% rispetto al controllo. Per le piante è stato osservato un effetto fito e genotossico, con una notevole inibizione della crescita e un danno al DNA di circa il 50% legato probabilmente alla nano taglia, alla concentrazione di Zn e alla modalità dispersione.

Keywords: ecotossicologia, nanoparticelle, suolo, microorganismi, piante

## **Introduzione**

Le nanoparticelle ingegnerizzate a base di metalli (NPM), in particolare di zinco, vengono ampiamente utilizzate per la produzione di cosmetici, creme, coloranti, agenti antibatterici e prodotti agrochimici (Shen et al., 2015). Il notevole incremento del loro utilizzo porterà inevitabilmente ad un aumento della dispersione delle NPM nell'ambiente con possibili conseguenze avverse dal punto di vista ecologico ed ambientale (Chai et al., 2015). Il loro rilascio può avvenire da fonti puntuali come gli impianti di produzione, le discariche o gli impianti di trattamento delle acque reflue e da fonti non puntuali (Nowack e Bucheli 2007). Una volta rilasciate nell'ambiente, il destino e la diffusione delle NPM, sono principalmente legati alle caratteristiche chimico-fisiche (Tourinho et al., 2012). Sulla base di queste caratteristiche, le NPM potranno andare incontro a processi di trasformazione come l'aggregazione/l'agglomerazione, l'assorbimento alla superficie e la dissoluzione da cui dipende il loro destino ed il loro effetto sul comparto biotico (Tourinho et al., 2012).

Le NPM possono quindi interagire con gli organismi del suolo, come le comunità microbiche, i funghi, le piante e gli invertebrati causando degli

effetti negativi sia a livello del singolo individuo che della popolazione e poi della comunità e dell'intero ecosistema (Navarro 2008).

Molti studi hanno descritto l'effetto delle nanoparticelle di zinco per i microorganismi (Hedge et al., 2011, Rousk et al., 2012, Garcia-Gomez et al., 2015, Shen et al., 2015), per le piante (Manzo et al., 2011, Miglietta et al., 2015) e per gli invertebrati (Roh et al., 2009, Tourinho et al., 2012) nel suolo.

In generale, gli effetti tossici sono principalmente ascrivibili alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano la membrana cellulare (Hedge et al., 2016).

Nel nostro studio abbiamo analizzato gli effetti delle nanoparticelle di ossido di zinco (nZnO) sia sulla comunità microbica del suolo sia sulle piante utilizzando un approccio combinato tra analisi ecotossicologica ed analisi dell'attività della comunità microbica, focalizzando la nostra attenzione su due diverse concentrazioni di ZnO e su due metodi di dispersione delle NPM nel suolo: wet e dry (Miglietta et al., 2015), al fine di valutare le eventuali differenze di effetto dovute allo stato chimico fisico delle nZnO.

Inoltre al fine di valutare l'azione tossica della nano particelle di zinco, in relazione alla taglia e al rilascio di ioni zinco, è stato valutato anche l'effetto di ZnO non nano (con dimensioni maggiori di 100 nm, bulk ZnO) e dello zinco in forma ionica, (ZnSO<sub>4</sub>).

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

Lo strato superficiale (circa 5-10 cm) di suolo agricolo è stato campionato nei pressi di San Giorgio a Cremano (Napoli) nel mese di settembre, setacciato a 2 mm, conservato e stabilizzato per una settimana a 4° C al buio fino all'esecuzione dei saggi biologici. Le proprietà chimico fisiche del suolo sono state analizzate (peso secco, umidità, pH, carbonio ed azoto, concentrazione di zinco elementare) sulla base dei metodi standard per la caratterizzazione del suolo (Nelson e Sommer 1996).

Successivamente il suolo è stato trattato utilizzando i seguenti composti di zinco: nanoparticelle di ossido di zinco (nZnO Sigma-Aldrich (cod. 544906)), ossido di zinco bulk (bZnO, Galeno S.r.l., polvere per la formulazione farmaceutica), e il solfato di zinco (ZnSO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich). Le caratteristiche dei rispettivi composti sono riportate nella tabella 1, ed ulteriori informazioni sono riportate in Miglietta et al., 2015.

*Tabella 1. Caratteristiche dei composti dello zinco*

Caratteristiche dei composti dello zinco	Zinco nano	Zinco bulk
Dimensione (nm)	<100	>200
Superficie (m <sup>2</sup> /g)	15-25	4-7

Le particelle di ZnO sono state aggiunte al suolo in due concentrazioni: 115 e 230 mg Zn/kg e secondo due modalità di dispersione: wet e dry. La modalità wet prevede l'aggiunta al suolo di una sospensione di nZnO, bZnO e ZnSO<sub>4</sub> disperse in acqua distillata. Il volume di acqua aggiunto al

suolo è stato calcolato in modo da raggiungere una capacità di campo del 60%. Nella modalità di dispersione dry, nZnO e bZnO (tranne ZnSO<sub>4</sub>), sono stati aggiunti a secco, miscelati al suolo per ottenere una distribuzione omogenea, e successivamente è stata aggiunta acqua fino a raggiungere la capacità di campo desiderata (60%). In seguito, i suoli trattati ed il suolo non trattato (controllo) sono stati incubati al buio, a 25 °C per tutta la durata degli esperimenti: 14 giorni per la caratterizzazione della comunità microbica e 21 giorni per i test di ecotossicità sulle piante. La comunità microbica è stata caratterizzata in termini di attività respiratoria, misurata mediante il metodo titrometrico di Alef e Nannipieri (1995). Sono state analizzate le attività enzimatiche (fosfatasi e deidrogenasi) utilizzando il metodo spettrofotometrico (Tabatai e Bremner 1969, Trasar et al., 2000).

I test di ecotossicità sono stati effettuati su *Lepidium sativum* analizzando l'indice di germinazione, l'allungamento radicale e la percentuale di effetto sul incremento ponderale (Environmental Canada, 2007), e la genotossicità mediante il Comet assay, come percentuale di nuclei integri osservati (Sigh et al. 1988).

## Risultati

Il suolo selezionato per il nostro caso studio è costituito dal 78% di peso secco ed un restante 22% di umidità, e con un pH 6,5. Il contenuto di carbonio ed azoto risulta rispettivamente del 2,5% e dello 0,31%. Il valore base di zinco del suolo risulta intorno a 130 mg Zn/kg (comunicazione personale).

I risultati relativi al tasso di respirazione della comunità microbica sono stati rappresentati nella figura 1

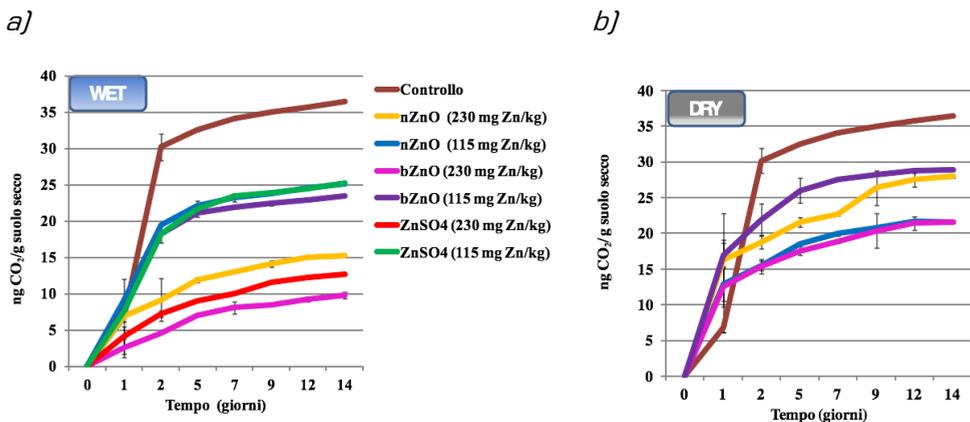


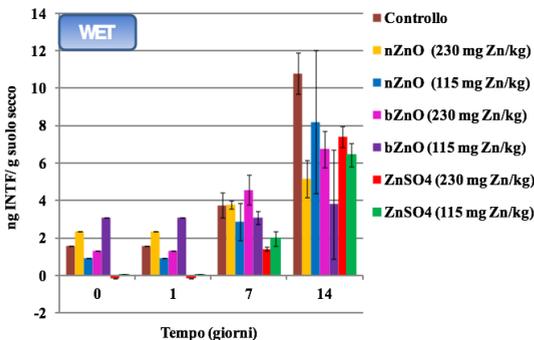
Figura 1. Respirazione della comunità microbica (ngCO<sub>2</sub>/grammo di suolo secco) in suoli trattati con nZnO, bZnO, ZnSO<sub>4</sub> alle concentrazioni di 115 e 230 mgZn/kg con modalità di dispersione: a) wet e b) dry

Per tutti i trattamenti (Figura 1) è possibile osservare un evidente effetto negativo a partire dalle 24 ore. In particolare, i maggiori effetti di inibizione sono stati osservati alla concentrazione di 230 mg Zn/kg per tutti i

trattamenti, nella modalità di dispersione wet ( $p < 0,05$ ) (Figura 1a). Infatti, il tasso di respirazione risulta mediamente ridotto del 73%, 65% e 58%, rispetto al controllo. Nella modalità dry, invece, è possibile evidenziare un effetto stimolante entro le 24 ore in tutti i suoli trattati ed un effetto inibitorio inferiore rispetto al wet, indipendentemente dalla concentrazione dei composti di zinco, raggiungendo un valore intorno al 41% rispetto al controllo (figura 1b).

L'attività enzimatica della comunità microbica è stata testata relativamente alla fosfatasi ed alla deidrogenasi. L'attività deidrogenasica risulta ridotta al 14° giorno per tutti i trattamenti rispetto al controllo, in entrambe le modalità wet and dry. In particolare un maggiore decremento è stato osservato nei suoli trattati con nZnO 230 mg Zn/kg e bZnO 115 mg Zn/kg, rispettivamente del 52% e del 65% nel trattamento wet, e del 46% e del 39% nel trattamento dry. Contrariamente, nelle prime 24 ore, nei suoli trattati in Wet con nZnO 230 mg Zn/kg e bZnO 115 mg Zn/kg, è stato osservato un effetto stimolante rispettivamente del 32% e del 49%. Questo effetto stimolante rimane invariato nel caso dei suoli trattati in Dry con nZnO 230 mg Zn/kg, ed aumenta nei suoli trattati con bZnO 115 mg Zn/kg (70%). Inoltre, la maggiore percentuale di riduzione (97%) dell'attività deidrogenasica è stata osservata nelle prime 24 ore nei suoli trattati con ZnSO<sub>4</sub> 115 mg Zn/kg (Figura 2a). Diversamente dall'attività deidrogenasica, nessun effetto è stato riscontrato sull'attività fosfatasi.

a)



b)

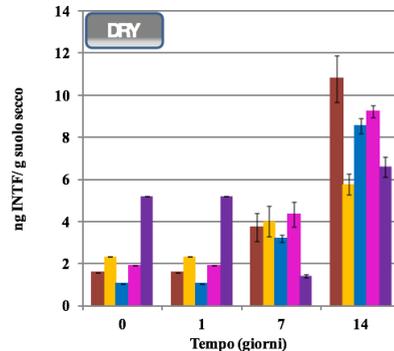


Figura 2. Attività deidrogenasica (ng INTF/g di suolo secco) della comunità microbica in suoli trattati con nZnO, bZnO e ZnSO<sub>4</sub> alle concentrazioni di 115 e 230 mg Zn/kg con modalità di dispersione: a) wet e b) dry.

I risultati dei test di fitotossicità mostrano, ad eccezione dei trattamenti bZnO e ZnSO<sub>4</sub> (115 mg Zn/kg), un effetto maggiore sulla germinazione nella condizione wet rispetto a quella dry (Figura 3a – b). In particolare nel trattamento dry si osserva un generale effetto stimolante sulla germinazione, solo nZnO alla concentrazione maggiore provoca un lieve effetto inibitorio (7 %). nZnO alla concentrazione di 230 mg Zn/kg esercita un effetto tossico doppio sull'allungamento radicale nella modalità

wet rispetto a quella dry (Figura 3a – b). Non si evidenziano differenze rilevanti per le altre due sostanze (Figura 3a – b).

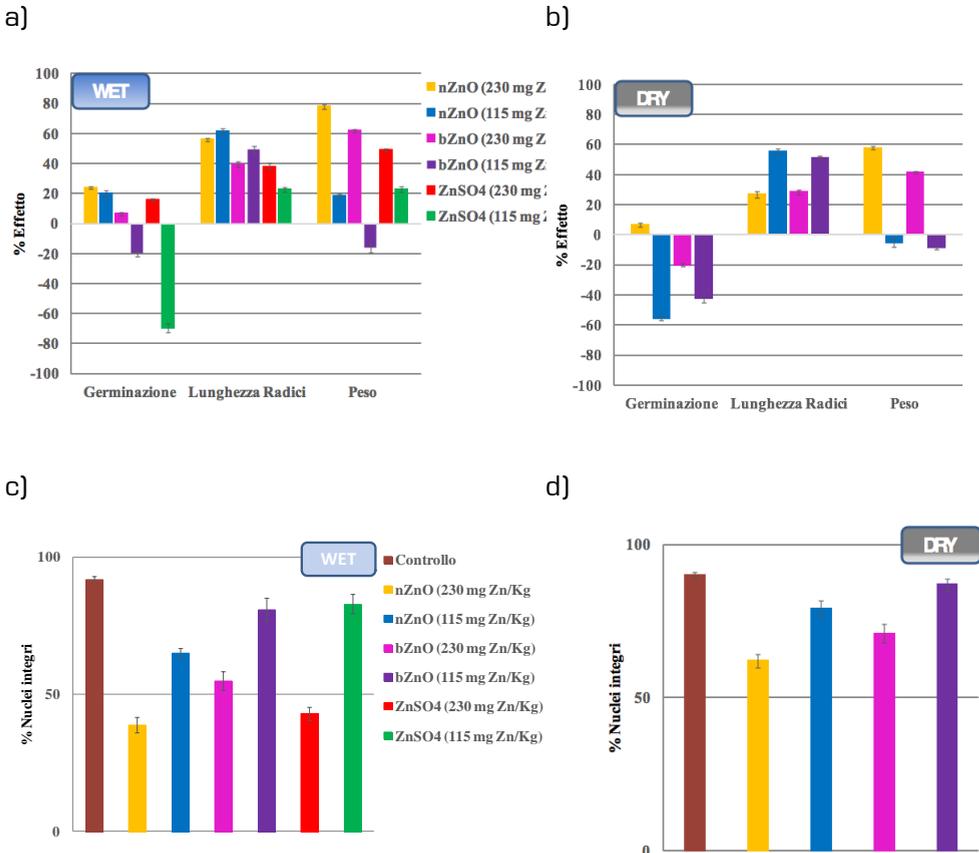


Figura 3. Percentuale di effetto sulla germinazione, la lunghezza delle radici, e sul peso di *Lepidium sativum* in condizioni wet (a) e dry (b); e di genotossicità in condizioni wet (c) e dry (d) in tutti i trattamenti compreso il controllo.

Nella figura 3c – d, sono riportati i risultati dei test di genotossicità. Nel caso del metodo di dispersione wet di nZnO e ZnSO<sub>4</sub> a 230 mg Zn/Kg si osserva una percentuale inferiore al 50% di nuclei integri, mentre nel caso di bZnO, tale percentuale aumenta fino al 55%. Un lieve effetto genotossico (65% di nuclei integri) si evidenzia anche alla concentrazione inferiore di nZnO (115 mg Zn/kg).

Nella modalità dry, è stato riscontrato un effetto genotossico inferiore sui nuclei di *Lepidium sativum* rispetto alla modalità wet, con una percentuale maggiore del 50% di nuclei integri per tutti i suoli trattati. nZnO, bZnO e ZnSO<sub>4</sub> a 230 mg Zn/Kg inibiscono notevolmente l'incremento ponderale delle piante con una percentuale di effetto rispettivamente del 78%, del 62% e del 49%; una lieve riduzione dell'effetto è stata invece riscontrata nella modalità dry pari al 58% per nZnO e al 41% per bZnO.

## *Discussione*

Molti studi hanno dimostrato l'impatto delle nanoparticelle di ossidi metallici sull'attività della comunità microbica del suolo, evidenziando effetti tossici sulla biomassa, sull'attività respiratoria e sulle attività enzimatiche (Navarro et al., 2008, Rousk et al., 2012, Simonin e Richaume 2015; Hedge 2016). In questo lavoro si evidenziano gli effetti dell'ossido di zinco sia nella forma nanoparticolata (nZnO), non nanoparticolata (bZnO) ed dello zinco ionico (ZnSO<sub>4</sub>), in relazione al metodo di dispersione. Infatti, il metodo di dispersione può influire sulle proprietà dei composti dello zinco, ed in particolare sulla loro distribuzione ed interazione con il suolo, influenzando fortemente il loro destino e il loro effetto tossicologico (Miglietta et al., 2015).

L'attività respiratoria e l'attività deidrogenasica risultano inibite in entrambe le modalità di dispersione, sebbene in modo più evidente nel trattamento wet,. L'attività fosfataseica invece non sembra essere influenzata dai composti dello zinco infatti non si osserva alcun effetto rispetto al suolo non trattato contrariamente a quanto riportato da altri autori (Garcia-Gomez et al., 2015). L'attività respiratoria dei microrganismi del suolo risulta fortemente modificata fin dalle prime 24 ore di esposizione a tutti i composti alla concentrazione maggiore (230 mg Zn/kg). Un andamento simile è stato riportato da Shen et al., 2015, per suoli trattati con nZnO alla concentrazione di 1000 mgZn/kg disperse con modalità dry.

Gli effetti maggiori sull'attività deidrogenasica sono stati osservati in tutti i trattamenti dopo 14 giorni di sperimentazione. Altri lavori hanno invece riportato una azione inibitoria fino a circa il 50% dell'attività deidrogenasica dopo 24 h ma a concentrazioni di nZnO molto più elevate (Shen et al., 2015).

I risultati dei test di tossicità sulle piante evidenziano in generale un maggiore effetto tossico di tutte le sostanze trattate nella modalità wet. Confrontando i risultati ottenuti in questo lavoro con quelli riportati da precedenti lavori (Manzo et al., 2011; Miglietta et al., 2015), in cui sono state testate le stesse concentrazioni, ma utilizzando un sedimento standard OECD, si evidenziano alcune discordanze. In particolare gli effetti maggiori sulla germinazione sono evidenziabili nella modalità wet (per le nano particelle di zinco e per la forma ionica) e non in quella dry, contrariamente a quanto precedentemente riportato. cio' potrebbe essere dovuto ad una differente modalità di dissoluzione dell'ZnO in suoli naturali ricchi di sostanza organica. In particolare Infatti, Miglietta et al., 2015, evidenzia come all'interno degli estratti del suolo arricchito con modalità dry vi sia una maggiore quantità di ioni di zinco rilasciati dalle nZnO rispetto alla modalità wet, che spiegherebbe i maggiori effetti tossici osservati. Nel suolo naturale, la presenza di sostanza organica e degli altri componenti del suolo sicuramente influenza il comportamento delle nZnO rendendole più biodisponibili quando somministrate in sospensione . Nella modalità wet, la germinazione di *Lepidium sativum* risulta maggiormente inibita dalle nZnO ad entrambe le concentrazioni, seguita dalla forma ionica dello zinco e dalla forma bulk a concentrazione

maggiore. Nella condizione dry, solamente le nZnO a concentrazione maggiore inibiscono la germinazione, ed un effetto biostimolante è stato osservato per gli altri composti. Anche in questo caso gli effetti sono differenti da quelli misurati precedentemente con il suolo artificiale in accordo con quanto riportato prima

Inoltre, Garcia-Gomez et al., 2015 non riportano alcun effetto negativo sulla germinazione delle piante, testando le nZnO ad una concentrazione maggiore (1000 mg Zn/kg di suolo), disperse in modalità dry. Nello stesso lavoro si evidenzia anche un effetto inibitorio causato da un'elevata dose di ZnCl<sub>2</sub> (1000 mg/kg suolo) probabilmente causata da una maggiore permeabilità del tegumento della pianta allo zinco ionico sulla germinazione, sulla lunghezza delle radici e sul peso delle piante. (Garcia-Gomez et al., 2015)

Gli effetti evidenziati sulla lunghezza delle radici mostrano ancora una volta come l'utilizzo di un suolo naturale e la diversa modalità di dispersione possano influire sull'effetto dei composti dello zinco. Infatti, sono evidenti delle differenze tra la modalità wet e quella dry. Nella modalità wet, l'effetto inibitorio è causato da nZnO < bulk ZnO < ZnSO<sub>4</sub> senza notevoli differenze tra le concentrazioni dei composti. Nella modalità dry, non è stata osservata alcuna differenza tra l'effetto delle nZnO e del bulk, ma risulta maggiore l'effetto delle concentrazioni più basse.

Nel lavoro precedente di Manzo et al., 2011, era stato osservato un moderato effetto tossico delle nanoparticelle sulla lunghezza delle radici, ed una biostimolazione nel caso dello zinco ionico che viene prontamente assimilato dalle piante producendo un effetto ormetico (Paschke et al. 2006, Manzo et al., 2011). Un simile effetto è stato riportato sulla lunghezza delle radici della pianta *Lepidium sativum* (in Miglietta et al., 2015), nelle condizioni dry e wet per tutti i composti.

Ulteriori effetti tossici dei composti dello zinco, sono stati osservati anche sull'incremento ponderale delle piante di *L. sativum*. In generale si osserva una diminuzione di peso, così come è stato riportato anche da Garcia-Gomez et al., 2015. In tutti i trattamenti. Similmente sono stati evidenziati Effetti di tutti i composti dello zinco alle concentrazioni maggiori sul DNA di *Lepidium sativum*. Tali effetti erano stati precedentemente riportati per nanoparticelle di zinco e dello zinco ionico alla concentrazione di 230 mg Zn/kg su *Vicia faba* testate su un suolo OECD, con la sola modalità di dispersione dry. Nel presente studio si registra un maggiore effetto genotossico nella modalità wet rispetto a quella dry, con un maggiore effetto causato dalle nano particelle di zinco, probabilmente causato da una maggiore biodisponibilità nel suolo naturale.

## ***Conclusioni***

In questo lavoro sono stati dimostrati gli effetti avversi di ZnO legati non esclusivamente alla nanotaglia sulla comunità microbica del suolo e sulle piante.

Gli effetti inibitori sulla comunità microbica risultano principalmente in relazione alla modalità di dispersione, dei composti testati piuttosto che alla loro concentrazione. Invece l'inibizione della crescita delle piante e il danno al DNA delle cellule vegetali sembrerebbero essere dipendenti dalla nanotaglia e dalla concentrazione di Zn.

Il confronto tra le due modalità di dispersione dei composti dello zinco sottolinea la variabilità degli effetti delle nano particelle in funzione della metodologia adottata. Quindi è opportuno sottolineare l'importanza di adottare dei protocolli comuni di dispersione e di tener conto nella valutazione dei risultati delle proprietà dei suoli studiati, e della loro interazione con NPM, al fine di poter valutare il reale rischio legato alla loro diffusione nell'ambiente.

### ***Bibliografia***

- Alef, K., Nannipieri, P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London: 576
- Bartkowiak, A., and Lemanowicz J. 2014. Application of biochemical tests to evaluate the pollution of the Unislaw Basin soils with heavy metals. *International Journal of Environmental Research* 8.1: 93-100.
- Environment Canada: 2007. Biological test method: test for measuring emergence and growth of terrestrial plants exposed to contaminants in soil. Method development and applications section. Ottawa, Ontario. Report EPS1/RM/45. ISBN 0-662-40284-7 Cat. no. En49-7/1-45E.
- Chai H., Yao J., Sun J., Zhang C., Liu W., Zhu M., Ceccanti B. 2015. "The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 94.4: 490-495.
- Garcia-Gomez, C., et al. "Integrating ecotoxicity and chemical approaches to compare the effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl<sub>2</sub> on plants and microorganisms in a natural soil." *Environmental Science and Pollution Research* 22.21 (2015): 16803-16813.
- Hegde, Krishnamoorthy, et al. 2016. Current understandings of toxicity, risks and regulations of engineered nanoparticles with respect to environmental microorganisms. *Nanotechnology for Environmental Engineering* 1.1: 5.
- Manzo, Sonia, et al. 2011. Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 18.5: 756-763.
- Miglietta, Maria Lucia, et al. 2015. Methodological issues about techniques for the spiking of standard OECD soil with nanoparticles: evidence of different behaviours. *Journal of Nanoparticle Research* 17.7: 1-12.
- Navarro, Enrique, et al. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17.5: 372-386.
- Nelson, D.W., and Sommers L.E. Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter. In D.L. Sparks (ed). *Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series Number 5. American Society of Agronomy, Madison, WI. (1996): 961-1010.
- Nowack, Bernd, and Thomas D. Bucheli. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment." *Environmental pollution* 150.1: 5-22.
- Paschke MW., Perry LG., Redente EF. 2006. Zinc toxicity thresholds for reclamation forb species. *Water Air Soil Pollut* 170: 317-330.

- Roh, Ji-yeon, et al. 2009. "Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics." *Environmental science & technology* 43.10: 3933-3940.
- Rousk, Johannes, et al. 2012. Comparative toxicity of nanoparticulate CuO and ZnO to soil bacterial communities. *PloS one* 7.3: e34197.
- Shen Z., Chen Z., Zhen H., Tinting L., Xiaoxia L. 2015. Ecotoxicological effect of zinc oxide nanoparticles on soil microorganisms 2015. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 9.5:912-918.
- Simonin, M., and Richaume A. 2015. Impact of engineered nanoparticles on the activity, abundance, and diversity of soil microbial communities: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22.18: 13710-13723.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1998. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.
- Tabatabai, M. A., and J. M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry* 1.4: 301-307.
- Tourinho, PS., van Gestel CA., Lofts S., Svedsen c., Soares AM., Loureiro S. 2012. Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31.8: 1679-1692.
- Trasar-Cepedaa C., Leiro´s M.C., S. Seoaneb S., Gil-Sotres F. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *SoilBiology&Biochemistry* 32:1867-1875.

# PROGETTO DI TUTELA DEL GAMBERO DI ACQUA DOLCE IN ALTO ADIGE: ESEMPIO DI APPLICAZIONE DI TEST DI FITOTOSSICITÀ

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** -. Nell'ambito del "Progetto di tutela del gambero di fiume" nella Provincia di Bolzano, a partire dal 2006 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 è stata estesa nel 2015 ad altri 5 corpi idrici situati sul territorio provinciale, alcuni con popolazioni di gamberi ancora relativamente intatte, altri in cui i gamberi risultano totalmente assenti. Parallelamente il Laboratorio analisi acque e cromatografia ha eseguito le analisi dei residui di fitofarmaci e di metalli pesanti sia sull'acqua superficiale che sui sedimenti. Tra le analisi svolte il test di fitotossicità ha evidenziato maggiore sensibilità rispetto alle altre indagini eseguite. In particolare per il sorgo è risultata significativamente inibita la crescita sia della radice che del germoglio in tutti i campioni di sedimento. La tossicità riscontrata mediante test ecotossicologici in alcuni sedimenti è risultata in alcuni casi correlata con la presenza di prodotti fitosanitari e valori di alcuni metalli pesanti rialzati. La differente consistenza della popolazione di gamberi in questi corsi d'acqua sembra essere comunque dovuta solo in parte alla tossicità dei sedimenti, mentre risulta essere maggiormente legata alla presenza di un habitat variegato, ricco di zone di riparo, e all'utilizzo del territorio circostante.

Keywords: ecotossicologia, sedimenti, test di fitotossicità, 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”, composto 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 è stata successivamente estesa ad altri corsi d’acqua situati sul territorio provinciale, per avere ulteriori dati di confronto, e in particolare nel 2015 sono stati monitorati 6 corpi idrici, aventi caratteristiche morfologiche, ambiente e popolazione di gamberi diversi tra loro. In particolare sono state svolte analisi ecotossicologiche multispecie su campioni di sedimento e di acqua superficiale del Rio Krebs, dell’ex Lido di Bressanone e della Fossa Buozzi, con popolazioni di gamberi ancora intatte e confrontate con le analisi condotte sui campioni di acqua e sedimento della Fossa Mühlgraben, del Rio Gambero e del Millander Au, nei quali i gamberi sono assenti.

Parallelamente il Laboratorio analisi acque e cromatografia ha eseguito le analisi dei metalli pesanti e dei residui di fitofarmaci sui sedimenti e 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 6 ambienti acquatici: 1) **Rio Krebs**, sito in zona montana con una stima di popolazione di gamberi di ca. 1000 individui. 2) **Ex Lido di Bressanone**, laghetto sito in centro città all’interno di un parco pubblico con una stima di popolazione di gamberi di ca. 1000 individui. 3) **Fossa Buozzi**, sita a sud della zona industriale di Bolzano con una stima di popolazione di gamberi di ca. 2.000 individui. 4) **Fossa Mühlgraben**, sita a sud della zona industriale di Bolzano con una stima di popolazione di gamberi di ca. 0 individui. 5) **Rio Gambero**, sito a Lana (Merano sud), circondato da meleti e confinante con un campo da golf con una stima di popolazione di gamberi di ca. 0 individui. 6) **Millander Au**, stagno sito a Bressanone

(località Millan), circondato da meleti con una stima di popolazione di gamberi di ca. 0 individui.

Per valutare la tossicità dei campioni in esame, sono stati utilizzati i test riportati in tabella 1.

Tabella 1. test di tossicità utilizzati

ORGANISMO	MATRICE	DURATA	METODO	END POINT
<i>Daphnia magna</i>	Acq. Sup. Elutriato	24 h	Acuto CNR-IRSA	Immobilizzazione
<i>Vibrio fischeri</i>	Acq. Sup. Elutriato	5', 15', 30'	Comparison Basic Solid Phase Test	Inibizione bioluminescenza
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Acq. Sup. Elutriato	72 h	UNI ENI 28692/20 12	Inibizione crescita
<i>Cucumis sativus</i> <i>Lepidium sativum</i> <i>Sorghum saccharatum</i>	Sedimento Elutriato	72 h	UNICHIM 1651 (2003)	Germinazione Allungamento radicale

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.

Il Laboratorio analisi acque e cromatografia ha eseguito le analisi dei metalli pesanti e dei residui di fitofarmaci sia sui sedimenti che sull'acqua superficiale seguendo le metodiche previste dalla normativa.

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 viene 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 quest'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 saggati mediante l'analisi della varianza (ANOVA univariata).

## Risultati

I risultati delle analisi ecotossicologiche e chimiche sono riassunti in Tabella 2 e 3..

Tabella 2. Risultati analisi ecotossicologiche

Punto di prelievo	MATRICE	Daphnia magna	Vibrio fischeri	Test algale
Fossa Buozzi		%mortalità	% inibizione biolum.	% inibizione accrescim.
	Acq. Sup.	0	-9,37	9,28
	Elutriato	0	1,52	13,72
	Sedimento	n.r.	Non calcolabile	n.r.
Fossa Mühlgraben	Acq. Sup.	0	0,79	15,64
	Elutriato	0	14,42	2,35
	Sedimento	n.r.	2449 mg/l	n.r.
Rio Gambero	Acq. Sup.	0	-10,41	20,31
	Elutriato	0	28,96	7,4
	Sedimento	n.r.	9790 mg/l	n.r.
Rio Krebs	Acq. Sup.	0	-12,66	10,29
	Elutriato	0	-6,31	12,78
	Sedimento	n.r.	65160 mg/l	n.r.
Ex Lido Bressa-none	Acq. Sup.	0	8,66	6,81
	Elutriato	0	2,74	5,42
	Sedimento	n.r.	37140 mg/l	n.r.
Millander Au	Acq. Sup.	0	-9,99	0,84
	Elutriato	0	79,26	12,88
	Sedimento	n.r.	7674 mg/l	n.r.

Tossicità >20%, oppure differenza significativa,  $p < 0,01$

Debole tossicità, oppure differenza significativa,  $p < 0,05$

n.r.= non rilevato

Tabella 3. Risultati analisi fitotossicità e analisi chimiche

Punto di prelievo	MATRICE	fitotossicità	fitotossicità	fitotossicità		Metalli pesanti	Residui fitofarmaci
				Allung. Radicale mm Cetriolo	Allung. Radicale mm Crescione		
Fossa Buozzi		Allung. Radicale mm Cetriolo	Allung. Radicale mm Crescione	Allung. Radicale mm Sorgo	Allung. Germoglio mm Sorgo	mg/kg ss	µg/l
	Acq. Sup. Elutriato	n.r. 31,89	n.r. 54,13	n.r. 31,19	n.r. 28,21	n.r. n.r.	<LOQ n.r.
	Sedimento	21,97	61,58	25,65	10,03	Zn superiore ai dati bibliografici	<LOQ
Fossa Mühlgraben	Acq. Sup. Elutriato	n.r. 31,37	n.r. 53,67	n.r. 33,12	n.r. 30,68	n.r. n.r.	<LOQ n.r.
	Sedimento	24,12	66,92 (ormesi)	27,24	16,46	Bassa concentrazione	<LOQ
	Acq. Sup. Elutriato	n.r. 47,48	n.r. 64,20 (ormesi)	n.r. 31,41	n.r. 31,32	n.r. n.r.	<LOQ n.r.
Rio Gambero	Sedimento	37,08	74,79 (ormesi)	31,05	13,49	Arsenico alto	Clorpirifos; DDD;DDE;DDT

Rio Krebs	Acq. Sup.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	<LOQ
	Elutriato	33,35	47,88	35,08	36,26	n.r.	n.r.
	Sedimento	17,67	59,65	23,79	13,00	n.r.	n.r.
Ex Lido Bressanone	Acq. Sup.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	<LOQ
	Elutriato	51,13	53,95	32,13	33,26	n.r.	n.r.
	Sedimento	36,41	64,98	27,03	18,72	Zn superiore ai dati bibliografici	<LOQ
Millan-der Au	Acq. Sup.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	<LOQ
	Elutriato	55,9	68,73 (ormesi)	47,92 (ormesi)	37,89	n.r.	n.r.
	Sedimento	42,18	57,92	30,95	16,28	Bassa concentrazione	<LOQ

Tossicità >20%. oppure differenza significativa,  $p < 0,01$

Debole tossicità, oppure differenza significativa,  $p < 0,05$

n.r.= non rilevato

LOQ: limite di rilevabilità

Per quanto riguarda il Test con *Daphnia magna*, non è stata rilevata tossicità in nessuno dei campioni analizzati. Il Test con i batteri bioluminescenti *Vibrio fischeri* sull'acqua superficiale ed elutriati, non ha evidenziato tossicità, tranne che per i campioni di elutriato del Rio Gambero e del Millander-Au. Per quanto riguarda l'analisi con *Vibrio fischeri* per i campioni di sedimento, tutti i campioni hanno evidenziato inibizione della bioluminescenza, tranne la Fossa Buozi.

Il Test algale subcronico a 72 ore con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* ha evidenziato una lieve tossicità solamente nel campione di acqua superficiale del Rio Gambero.

Per quanto riguarda il test di fitotossicità con semi, differenze molto significative sono state rilevate per l'allungamento della radice e del germoglio del **sorgo** di tutti i campioni di sedimento, risultando così il **seme più sensibile**.

Il cetriolo ha invece evidenziato un'inibizione molto significativa della crescita radicale nel campione di sedimento della Fossa Mühlgraben, della Fossa Buozi e del Rio Krebs. Analogamente è stata riscontrata inibizione della crescita radicale del crescione nel campione di elutriato del Rio Krebs. In alcuni casi inoltre è stata rilevata biostimolazione (ormesi) nella crescita radicale dei semi di sorgo e crescione, sia su campioni di elutriato che di sedimento.

## ***Discussione***

Mettendo a confronto i risultati ottenuti applicando diversi test ecotossicologici su matrici diverse è evidente che il **test più sensibile è risultato quello di fitotossicità**, in particolare quando applicato sul sedimento, dimostrando come i sedimenti siano uno dei comparti più efficaci per il monitoraggio ambientale, in quanto in essi convergono i processi di concentrazione degli inquinanti organici ed inorganici.

Come atteso però, l'utilizzo contemporaneo di più specie di semi ha talvolta evidenziato risposte discordanti, dove alcuni semi indicavano assenza di tossicità, altri biostimolazione o inibizione della germinazione e/o dell'allungamento radicale. Le differenze dipendono dalla diversa sensibilità dei semi ai tossici presenti nei campioni e consentono di ipotizzare una differente modalità di azione dei tossici stessi che, ad esempio, potrebbero agire preferenzialmente sulle monocotiledoni o sulle dicotiledoni. (Beltrami *et al.*, 2007). Si è provato a comparare questi risultati con quelli delle analisi chimiche effettuate. La concentrazione dello zinco risulta più elevata nel sedimento del campione prelevato presso l'Ex Lido Bressanone e nella Fossa Buozi. Questi due ambienti sono però caratterizzati da un trend positivo per quanto riguarda la popolazioni di gamberi. Il valore dell'arsenico, di origine geologica, risulta più elevato nel sedimento del Rio Gambero, rispetto ai valori riportati in bibliografia (Merian, 1984).

I valori dei residui di alcuni prodotti fitosanitari risultano superiori al limite rilevabile solo nel sedimento del Rio Gambero.

## ***Conclusioni***

Dalle analisi svolte emerge in generale una maggiore tossicità nei campioni di sedimento e in alcuni elutriati di sedimento, prelevati in particolare nella Fossa Mühlgraben, nel Millander-Au e nel Rio Gambero. In quest'ultimo è stata rilevata la presenza di prodotti fitosanitari. In questi ambienti i gamberi sono completamente scomparsi.

L'inibizione della crescita dei semi nel sedimento del Rio Krebs, è probabilmente dovuta alla quasi totale assenza di acqua nel torrente, a causa della forte siccità nell'estate del 2015.

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).

In particolare l'applicazione del test di fitotossicità sembra offrire una valida metodologia per descrivere la tossicità dei sedimenti (Gazzola *et al.*, 2007), che risultano essere uno dei comparti più efficaci per il monitoraggio ambientale. Con il test di fitotossicità sul sedimento tal quale è infatti 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.

La differente consistenza della popolazione di gamberi in questi corsi d'acqua non sembra però essere dovuta esclusivamente alla tossicità dei sedimenti, ma ruolo determinante ha la struttura dell'habitat e la presenza di un substrato diversificato. I gamberi di acqua dolce sono infatti buoni indicatori di un ambiente strutturalmente ricco (Pöckl *et al.*, 1999).

## ***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***

- 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.
- Beltrami, M., Gazzola, M., Baudo, R., (2007). "Test di fitotossicità per il monitoraggio di corsi d'acqua." 7° *Workshop Fitotox*, CNR-Milano, 10 maggio 2007.
- 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

Gazzola, M., Beltrami, M., Baudo, R., (2007). "Test di fitotossicità per i sedimenti acquatici." 7° *Workshop Fitotox*, CNR-Milano, 10 maggio 2007.

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 die 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).

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. 21pp.

Youden W. J. and Steiner E. H., *Statistical Manual of A. O. A. C.*, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., 1975

# L'ECOTOSSICOLOGIA NELLA GESTIONE DELLA BALNEABILITÀ DELLE ACQUE

by R. De Angelis <sup>a</sup>, F. Silvestri <sup>b</sup>, M. Scopelliti <sup>c</sup>

<sup>a</sup> ISPRA - roberta.deangelis@isprambiente.it

<sup>b</sup> Regione Lazio – Servizio Tutela delle Acque – fsilvestri@regione.lazio.it

<sup>c</sup> SOGESID SpA/MATTM - scopelliti.massimo@minambiente.it

---

**Abstract** - La proliferazione stagionale di alcune micro e macroalghe, è un fenomeno globalmente diffuso e del tutto naturale. Negli ultimi anni, a causa di diversi fattori, tra cui i cambiamenti climatici, si è osservato un aumento delle fioriture algali con dominanza di specie potenzialmente tossiche. Queste, in particolari condizioni ambientali, possono rilasciare nell'ambiente acquatico tossine che, a determinate concentrazioni, provocano sofferenza/morie di organismi acquatici ed effetti sulla salute umana, quali intossicazioni e reazioni cutanee. Le fonti principali di intossicazione sono i prodotti della pesca destinati al consumo umano e l'attività balneare. La direttiva europea 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione, tutela la salute umana imponendo misure di gestione volte a prevenire e mitigare eventuali criticità ambientali, tra le quali le proliferazioni algali di specie potenzialmente tossiche. Attraverso questo lavoro si vuole evidenziare come l'introduzione di saggi eco tossicologici nella valutazione della balneabilità di un'acqua, ad oggi scarsamente utilizzati, possa essere un utile strumento da affiancare ai protocolli di gestione, attualmente in uso, per prevenire e gestire i potenziali pericoli per i bagnanti e per l'ambiente acquatico.

Keywords: cianobatteri, *Ostreopsis cf ovata*, tossine, balneazione, saggi ecotossicologici, salute

## Introduzione

L'uso ricreativo di acque costiere ed interne può determinare alcuni impatti sulla salute dei bagnanti, causati da microrganismi patogeni e agenti chimico/fisici presenti nelle acque e nei sedimenti contaminati.

Per il controllo e la gestione della qualità delle acque di balneazione, la direttiva europea 2006/7/CE ha introdotto un nuovo approccio per la tutela della salute umana, basato sul monitoraggio di indicatori di contaminazione fecale e un'analisi ambientale volta all'identificazione di potenziali pericoli per la salute del bagnante eventualmente presenti nel territorio circostante l'acqua. In particolare, negli ultimi anni, a causa di diversi fattori, tra cui i cambiamenti climatici, negli ambienti acquatici, si è osservato un aumento delle fioriture algali con dominanza di specie potenzialmente tossiche, i cui effetti sono: sofferenza/morie di organismi acquatici ed effetti sulla salute umana, quali intossicazioni e reazioni

cutanee. Per le acque di balneazione potenzialmente interessate dalla presenza ricorrente di specie algali tossiche, devono essere adottate appropriate misure di gestione, volte a contenere o eliminare gli effetti sulla salute. Per tale scopo, in Italia, ormai da alcuni anni sono in vigore protocolli operativi per la gestione di specie potenzialmente tossiche quali, la microalga bentonica *Ostreopsis cf. ovata* per le acque costiere e alcune specie di cianobatteri per le acque lacustri. Il monitoraggio delle specie algali viene eseguito sulla base di protocolli operativi, che prevedono diverse fasi. Quest'ultime vanno dal campionamento alle analisi tossicologiche, che talvolta richiedono tempi, costi e strumentazione non sempre coerenti con quanto a disposizione delle varie ARPA. Inoltre, ad oggi l'unica misura di gestione adottata con regolarità è il divieto di balneazione. Per tali ragioni appare utile proporre, in un'ottica di gestione integrata, l'uso dell'ecotossicologia. Lo scopo dei saggi ecotossicologici è quello di verificare se un composto potenzialmente tossico, o un campione ambientale, causa una risposta biologica rilevante negli organismi utilizzati per il test.

Nella gestione del rischio sanitario nelle acque di balneazione, questa metodologia potrebbe, in modo facile e alla portata della maggior parte degli operatori, fornire uno strumento in grado di definire gli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi con lo scopo di proteggere l'intero ecosistema e consentire una più accurata valutazione del pericolo per la salute umana.

### ***Discussione***

Dall'esame della letteratura riguardante l'uso dei saggi ecotossicologici nella gestione del rischio sanitario nelle acque di balneazione, con particolare riguardo all'impatto provocato dai blooms algali di specie potenzialmente tossiche, è emerso uno scarso utilizzo dei saggi ecotossicologici a tale scopo. Un approccio generale è riportato nei manuali ISPRA "I Manuali di Ecotossicologia", in cui vengono proposte batterie di saggi biologici per un loro possibile utilizzo nell'ambito di indagini ambientali di vario tipo. Tra gli obiettivi generici trattati nei manuali di Ecotossicologia, uno riguarda specificamente "Le autorizzazioni alla balneazione (possibili effetti dell'ambiente sull'uomo)" ed è essenzialmente inteso a prevenire possibili effetti indesiderati sull'uomo, quale frequentatore delle spiagge. Per tale obiettivo viene proposto l'uso di una batteria di saggi ecotossicologici, per permettere di valutare meglio e più direttamente l'entità dell'impatto (su un recettore reale o potenziale), a completamento del monitoraggio, in linea con una valutazione più d'insieme auspicata dalla direttiva 2006/7/CE.

Vengono tenuti in considerazione prevalentemente i comparti acqua e sedimenti, mentre il comparto acqua interstiziale è raccomandato. Un ulteriore criterio generale solitamente auspicato per l'identificazione degli organismi da utilizzare nei saggi sarebbe l'utilizzo di specie ecologicamente rilevanti e (possibilmente) autoctone. Inoltre, per valutazione della tossicità acuta, il manuale USEPA (2002) indica come idonei gli organismi di acqua dolce: *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia pulex* e *D. magna*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*.

Sulla base dell'analisi della letteratura si riportano sinteticamente i risultati di alcuni studi di saggi ecotossicologici specifici per le tossine algali.

#### **Per i cianobatteri:**

In uno studio eseguito con campioni di cianobatteri prelevati nel lago di Pozzillo in Sicilia, è stata valutata la tossicità della microcistina, utilizzando come microrganismi test *Vibrio fischeri*, *Artemia salina* e *Pseudokirchneriella sub-capitata*. La concentrazione di microcistina è stata determinata mediante saggio ELISA attestandosi sempre ad un valore pari a  $<1\mu\text{g/L}$ . Il test di tossicità acuta eseguito con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri* ha dato una percentuale di inibizione della bioluminescenza inferiore al 20%, il saggio di tossicità acuta con il crostaceo *Artemia salina* il 100% dei nauplii vitali, mentre il saggio algale di tossicità cronica con *Pseudokirchneriella sub-capitata* si è rivelato molto sensibile già a concentrazioni di 0,05  $\mu\text{g/L}$  di tossina. Quindi il test algale è un test molto efficace ed efficiente, se accoppiato con altri saggi tossicologici, per la gestione delle acque superficiali a rischio fioriture algali (Zuccarello P. et al. 2016).

In un'altro studio condotto, invece, su acque lacustri e costiere polacche (M. Bartoszewicz et al.) sono stati utilizzati gli organismi test *Thamnocephalus platyurus* e *Artemia franciscana*, su estratto cellulare, ceppi in coltura e campioni ambientali delle seguenti specie cianobatteriche: *Microcystis aeruginosa*; *Planktothrix agardhii*; *Oscillatoria sp.*; *Anabaena sp.*; *Anabaena crassa*; *Anabaena flos-aque*; *Aphanizomenon sp.*; *Calothrix sp.*; *Cylindrospermopsis raciborskii*; *Lygbya sp.*; *Phormidium sp.*; *Nodularia spumigena*; *Nodularia harveyana*. I risultati ottenuti hanno portato a ritenere inadatte le due specie di organismi test, almeno per quel che riguarda il loro utilizzo per valutazioni ecotossicologiche rispetto al rischio connesso con la balneazione e alle acque destinate al consumo umano. Infatti, tali specie sono risultate sufficientemente sensibili, in termini di mortalità, solo a concentrazioni di tossina troppo elevate per poter essere considerate in ambito di sicurezza balneare. In altri due recenti lavori (N.A. Herrera et al., 2015) sono stati testati gli effetti tossici di cianobatteri produttori della tossina MC-LR su cladoceri e, in particolare, su *Moina micrura*, *Daphnia laevis* e *Daphnia similis* in uno e su *Daphnia* spp nell'altro. I risultati mostrano, in entrambi gli studi, nel caso della *Daphnia* una affidabile corrispondenza tra l'aumento della concentrazione di cianobatteri/tossina e variazioni osservabili e misurabili di parametri comportamentali o nella fisiologia dell'organismo test (es.: nutrizione, fertilità, motilità, mortalità, etc). Le conclusioni tratte portano a considerare una serie di vantaggi oggettivi nell'utilizzo di questa specie per studiare gli effetti di blooms tossici di cianobatteri, visto che sembrano rappresentare un target diretto delle tossine. In particolare, tali vantaggi sono connessi alla trasparenza dell'organismo, il breve ciclo vitale, la facilità di manipolazione, la semplicità delle colture in laboratorio e i costi piuttosto ridotti. A questo va aggiunto l'aspetto particolarmente positivo di poter determinare gli effetti delle tossine su differenti parametri contemporaneamente.

#### **Per la microalga bentonica:**

Nei lavori analizzati sono stati valutati gli effetti di *Ostreopsis cf. ovata* in termini di tossicità acuta, nonché di effetti a livello cellulare e biochimico, in microrganismi test. 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, i quali comprendono: *Artemia salina*, *Artemia franciscana*, *Tigropus fulvus* (crostacei), *Amphibalanus amphitrite* (cirripedi), *Dicentrarchus labrax* (stadi giovanili di spigola), *Paracentrotus lividus* (echinodermi), *Dinophilus gyrocolliatus* (policheti) e *Vibrio fischeri*. I risultati dei test su crostacei evidenziano che, tra *Artemia franciscana* e *Tigropus fulvus*, la prima ha mostrato una maggiore sensibilità rispetto alla seconda (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 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 le specie e sempre in presenza dell'alga i maggiori effetti tossici si sono avuti con l'aumentare della temperatura. Rispetto a tutte le specie test utilizzate, *A. salina* si è dimostrata quella più sensibile (LC50 4 cell/ml). Inoltre le analisi istologiche hanno indicato che le cellule di *Ostreopsis* vengono ingerite da *Artemia salina*, contrariamente alle altre due specie di crostacei testate. Anche il polichete *Dinophilus gyrocolliatus* (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 (S. Gorbi et al., 2012; 2013) sono stati eseguiti su *Mytilus galloprovincialis* raccolti in siti impattati dalle fioriture ed è stata valutata la presenza delle tossine direttamente nei tessuti, mentre gli effetti biologici ed ecotossicologici avversi sono stati valutati attraverso alterazione della risposta immunologica, lisosomiale e neurotossica. In particolare, tra gli effetti tossici, sono stati apprezzati una significativa inibizione dell'attività della pompa sodio/potassio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi), riduzione dei granulociti, riduzione dell'attività fagocitaria e ridotta stabilità della membrana lisosomiale.

## **Conclusioni**

In considerazione del numero limitato di studi specifici finora disponibili, appare evidente quanto sia importante continuare ad incrementare gli studi sull'ecotossicologia al fine di mettere a punto procedure di facile applicazione e che diano risultati attendibili in tempi rapidi.

Pur non essendo, quindi, ancora possibile stabilire con certezza le specie chiave più idonee per valutare gli effetti ecologici delle fioriture algali di *Ostreopsis cf. ovata*, tuttavia, il crostaceo *Artemia salina* è risultato l'organismo modello più sensibile alla presenza di cellule vive della microalga bentonica con valori di LC50 inferiori a 4 cell/ml dopo 48h (Faimali et. al 2011).

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

Infine, sempre relativamente ad *O. cf. ovata*, 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.

Per quanto riguarda la tossicità dovuta a specie potenzialmente tossiche di cianobatteri, i cladoceri del genere *Dafnia* sembrano quelli maggiormente sensibili alle microcistine, con particolare riferimento alle MC-LR, tra le tossine più frequenti e più tossiche.

Inoltre, ci sono evidenze che il saggio algale di tossicità cronica eseguito con *Pseudokirchneriella sub-capitata* si è rivelato molto sensibile già a concentrazioni di 0,05 µg/L di microcistina.

Pertanto, per il comparto acqua tal quale e/o filtrata, sembra proponibile una batteria comprendente alghe, batteri e crostacei, con saggi su *Pseudokirchneriella subcapitata* a 72 h; *Vibrio fischeri* 15/30 min; *Daphnia magna* a 24 h. Per effettuare test anche sui solidi sospesi, è consigliato il saggio con *Vibrio fischeri* 15/30 min.

Per il futuro è auspicabile la formulazione di batterie più idonee alle specifiche criticità di un dato ambiente acquatico, derivanti da un'attività di sperimentazione, da parte di un numero adeguato di operatori (idealmente, tutte le ARPA e gli operatori coinvolti nel monitoraggio delle acque) per un periodo arbitrariamente stabilito (ad esempio, un anno). Considerando che il fenomeno delle fioriture algali, soprattutto durante il periodo estivo è sempre più in espansione i saggi ecotossicologici, ove adeguatamente testati e validati, rappresentano un utile strumento di screening per valutare un bloom algale, permettendo di discriminare rapidamente se questo interessa una specie tossica o meno, in attesa di poter identificare e quantificare con precisione la tossina.

L'interessante valenza di questa tipologia di saggi risiede anche nel fatto che rappresentano un metodo per la valutazione del rischio indotto da vari generi di tossine non solo per l'ecosistema acquatico ma anche per la salute umana.

### ***Ringraziamenti***

Gli autori desiderano ringraziare per la collaborazione le colleghe Cecilia Silvestri, Emanuela Spada e Patrizia Borrello del Dipartimento Tutela delle Acque Interne e Marine dell'ISPRA.

### ***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., 2009. 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 P., 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.

Bartoszewicz M., Mazur-Marzec H., Michalska M., Koboz J. Ecotoxicological testing in the studies on the toxicity of cyanobacterial blooms.

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., 2011. 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.

Herrera N. A., Palacio J., Echeverri L. F., Ferrao-Filho A. S., 2014. Effects of a cyanobacterial bloom sample containing microcystin-LR on the ecophysiology of *Daphnia similis*. *Toxicology Reports* 1, 909-914.

Herrera N. A., Echeverri L. F., Ferrao-Filho A. S., 2015. Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. *Toxicon* 95, 38-45.

ISPRA, 2011. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. Manuali e linee guida 67/2011.

ISPRA, 2013. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne. Manuali e linee guida 88/2013.

Matthew C. Phillips, Helena M. Solo-Gabriele, Alan M. Piggot, James S. Klaus, Yifan Zhang. Relationships between sand and water quality at recreational beaches. *Water Research*, Volume 45, Issue 20, 2011.

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.

Zuccarello P., Olivieri Conti G., Ledda C., Cristaldi A., Brundo MV, Ferrante M., 2016. Test tossicologici ed ecotossicologici per lo screening della tossicità algale in acque dolci superficiali. Comunicazione al XXVII congresso interregionale calabro-siculo della Società Italiana di Igiene. Cosenza 16-18 settembre 2016.

# VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DELLA DISINFEZIONE CON ACIDO PERACETICO SULLE ACQUE DI SCARICO URBANE

by A. Arizzi Novelli <sup>a</sup>, M. Melchiorri <sup>a</sup>, L. Mastrangioli <sup>a</sup>, N. Di Deo <sup>a</sup>, G. Sergiacomo <sup>b</sup>, E. Scamosci <sup>b</sup>, G. Surrichio <sup>b</sup>, C. Spatola Mayo <sup>c</sup>.

<sup>a</sup>Arta Abruzzo Sezione BTA Distretto di Pescara - [a.arizzi@artaabruzzo.it](mailto:a.arizzi@artaabruzzo.it)

<sup>b</sup>Arta Abruzzo Sezione CA Distretto di Pescara-e. [scamosci@artaabruzzo.it](mailto:scamosci@artaabruzzo.it)

<sup>c</sup> Arta Abruzzo - Distretto di Chieti - [c.spatola@artaabruzzo.it](mailto:c.spatola@artaabruzzo.it)

---

**Abstract.** Nel settore della depurazione, tra le diverse forme di disinfezione l'utilizzo dell'ipoclorito di sodio ha dimostrato di avere delle controindicazioni dovute alla formazione di clorammine, clorati, composti cancerogeni e genotossici. Per questo motivo ne è stato vietato l'utilizzo a vantaggio di metodi di disinfezione tra cui l'acido peracetico (PAA) che si pone come una delle valide alternative, sia per il suo elevato potere disinfettante che per il suo basso impatto ambientale. La Regione Abruzzo nel Piano di Tutela delle Acque ha stabilito, dal gennaio 2015, la sostituzione dei sistemi di disinfezione a clorazione con sistemi alternativi quali ozono, PAA, raggi UV o altri trattamenti di pari efficacia purché privi di cloro.

Nel presente lavoro è stata utilizzata una batteria di test tossicologici (*Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*; *Pseudokirchneriella subcapitata*) applicata alle acque di scarico di impianti di depurazione di agglomerati urbani con più di 2000 abitanti equivalenti e campionate nel 2015/2016 nelle province di Pescara e di Chieti al fine di valutare gli effetti dovuti all'utilizzo di PAA.

I risultati ottenuti hanno mostrato una risposta discriminante tra gli organismi utilizzati, con una maggiore capacità da parte del test algale di individuare i fuori limite sulla maggior parte dei campioni analizzati. E' stata altresì ipotizzata la concentrazione di perossido residuo (0,5 mg/L) tale da minimizzare il rischio di avere un effetto tossico indotto dall'utilizzo del disinfettante.

Keywords: depurazione, acido peracetico, saggi di tossicità

## **Introduzione**

Nel presente lavoro è stata utilizzata una batteria di saggi tossicologici applicata alle acque di scarico di impianti di depurazione di agglomerati urbani campionate nel 2015 e parte nel 2016 (primo semestre) nelle province di Pescara e di Chieti.

Per ognuno dei campioni è stata effettuata l'analisi chimica del contenuto del residuo di PAA sotto forma di perossido e sono state analizzate 101 acque di scarico di 38 depuratori delle due province con potenzialità comprese tra 1.000 e 150.000 abitanti equivalenti.

Come riportato sul D.lgs 152/06 (Tab. 3 Allegato 5), relativamente alle acque di scarico, il saggio di tossicità è obbligatorio e oltre al saggio su *Daphnia magna*, possono essere eseguiti altri saggi di tossicità. Nel presente lavoro è stata scelta una batteria di tre saggi tossicologici comprendente il batterio *Vibrio fischeri* (test "acuto" con esposizione a 30'), le alghe della specie *Pseudokirchneriella subcapitata* (test "acuto" con esposizione per 72h) ed il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna* (test "acuto" con esposizione per 24h) di cui sono disponibili metodologie standardizzate.

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

Per ognuno dei campioni è stata effettuata l'analisi chimica del contenuto del residuo di PAA sotto forma di perossido mediante metodo fotometrico. Il saggio di tossicità con *Vibrio fischeri* è stato applicato seguendo la metodica UNI EN ISO 11348-3: 2009 con esposizione dei batteri per 30' a campioni di acque reflue. I risultati sono stati espressi come percentuale di effetto o percentuale di inibizione della bioluminescenza (l %) ottenuti applicando il saggio sul campione tal quale.

Il saggio di tossicità con l'alga dolce della specie *Pseudokirchneriella subcapitata* è stato eseguito utilizzando il kit commercialmente disponibile e facendo riferimento alla norma ISO 8692:2012. Le colture algali sono state preparate prima dell'esecuzione delle fasi analitiche e sono state esposte in fase di crescita esponenziale a campioni di acque di scarico tal quale in 3 repliche. I contenitori con gli organismi, sono stati incubati per un periodo di  $72 \pm 2$ h al termine del quale sono stati fissati in formalina per permettere la lettura. Quest'ultima è stata eseguita mediante contatore di cellule Beckman Coulter e l'elaborazione statistica è stata realizzata con il programma "Calcolo delle ECx del saggio algale" per la valutazione dell'inibizione della crescita.

Per quanto riguarda *Daphnia magna*, sono stati utilizzati organismi ottenuti dalla schiusa di efippi mediante kit commercialmente disponibile e applicando la norma UNI EN ISO 6341:2012. Una volta ottenuti organismi della stessa età, dopo la fase di schiusa di 72 h a temperatura e luce costanti ( $20 \pm 1$  h e 6000 lux), si è proceduto all'esposizione al buio per 24 h a campioni di acque di scarico in 3 repliche. Alla fine del test, si è proceduto alla conta degli organismi immobilizzati rispetto al controllo (sola acqua di diluizione) poiché l'endpoint misurato è rappresentato dall'immobilizzazione e l'obiettivo è stato determinare la diluizione di campione che causa l'immobilizzazione del 50 % degli organismi dopo 24 h di esposizione.

### ***Risultati***

I risultati ottenuti con i tre diversi organismi applicati alle acque di scarico, per un totale di 101 campioni provenienti dai 38 depuratori, sono riportati in Fig.1.

Con il *Vibrio fischeri* si è osservato che il 9 % dei campioni analizzati mostra un superamento del valore limite di legge (50 %).

Con il test algale sono stati riscontrati circa il 17 % di campioni non conformi e sono stati osservati modesti fenomeni di biostimolazione. Con la *Daphnia magna*, è stata riscontrata tossicità superiore al 50 % sul 3 % dei campioni analizzati e l'immobilizzazione è stata nulla o estremamente ridotta nella maggioranza dei campioni analizzati rispetto al controllo ( $p > 0,05$  al 95 % del livello di significatività statistica).

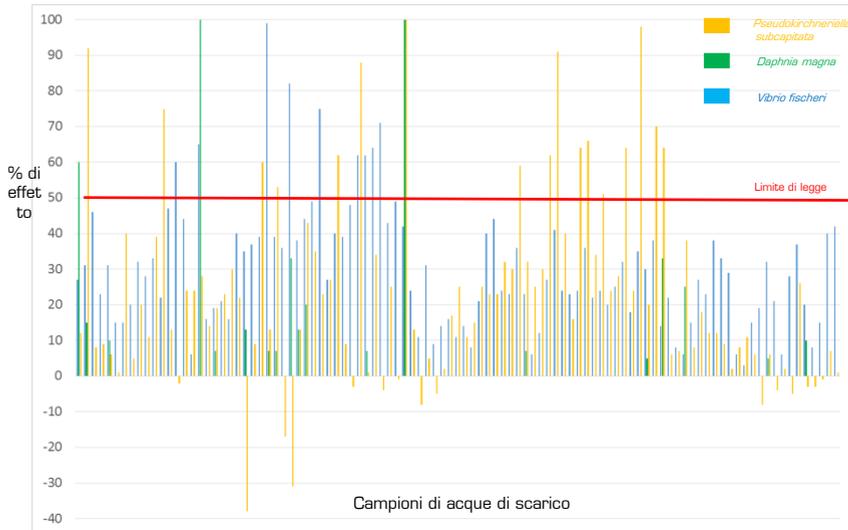


Figura 1. Risultati ottenuti con la batteria di tre saggi applicati alle acque di scarico degli impianti indagati nel 2015 e primo semestre 2016.

Contesualmente alle analisi effettuate sugli scarichi, è stata valutata la sensibilità di ognuno dei tre organismi verso il PAA ottenendo valori di  $EC_{50}$ . Sono state condotte prove applicando i saggi su concentrazioni scalari di PAA preparando soluzioni con le acque di diluizione compatibili con l'organismo test e partendo da un valore di acido peracetico al 36-40 % in acido acetico (Sigma Aldrich).

I risultati ottenuti hanno mostrato per il *V. fischeri* un valore di  $EC_{50}$  a 30' di 0,26 mg/L (limiti fiduciali al 95 % 0,21-0,36 mg/L), per l'alga *P. subcapitata* un valore di  $EC_{50}$  a 72h di 0,29 mg/L (limiti fiduciali al 95 % 0,20-0,38) e per il crostaceo *D. magna* una  $EC_{50}$  a 24 h di 1,34 mg/L (limiti fiduciali al 95 % 1,20-1,50). Tali risultati evidenziano una sensibilità confrontabile fra batteri ed alghe e confermerebbero la minore sensibilità del crostaceo, come ben evidenziato dalle risposte che si ottengono con i campioni ambientali.

Al fine di individuare un valore di PAA che nell'ambito degli organismi utilizzati per la valutazione ecotossicologica delle acque di scarico, minimizzi il rischio di avere un effetto tossico indotto dall'utilizzo del suddetto disinfettante, è stato effettuato un confronto tra i dati di tossicità con le concentrazioni di perossido. Nella Fig.2. vengono riportate le percentuali di effetto ottenute con due saggi di tossicità (*V.fischeri* e *D.magna*) in funzione della concentrazione di perossido rilevate nei campioni di acque di scarico di alcuni depuratori che avevano cominciato ad utilizzare tale disinfettante (2013/2014) e quelle ottenute con la

batteria di 3 test applicata ai campioni del 2015 e del primo semestre 2016.

Dividendo il grafico in quattro quadranti, si osserva che fino ad un valore di circa 0,5 mg/L di perossido, il 90 % dei campioni risulta conforme ai limiti di legge (quadrante I).

Nel quadrante II troviamo il 10 % dei campioni che mostrano un elevato valore di tossicità fino ad una concentrazione di 0,5 mg/L di perossido; per questi campioni, l'analisi chimica non ha rilevato la presenza di sostanze tossiche diverse (es. metalli pesanti), ma la presenza di altri analiti potrebbe aver portato ad un segnale di tossicità. Infatti a tale riguardo, ulteriori indagini saranno necessarie su parametri come l'ammoniaca che potrebbero essere considerati dei fattori di confusione nell'individuazione di segnali di tossicità.

Nei quadranti III e IV si osserva che ad una concentrazione che va da 0,6 a 2 mg/L, si ottiene circa un 40 % di campioni che risultano non conformi.

Si è osservato, infine, che la percentuale di campioni che presentano tossicità aumenta all'aumentare della concentrazione di perossido fino a rilevare un 90 % di campioni non conformi per concentrazioni di perossido >5 mg/L.

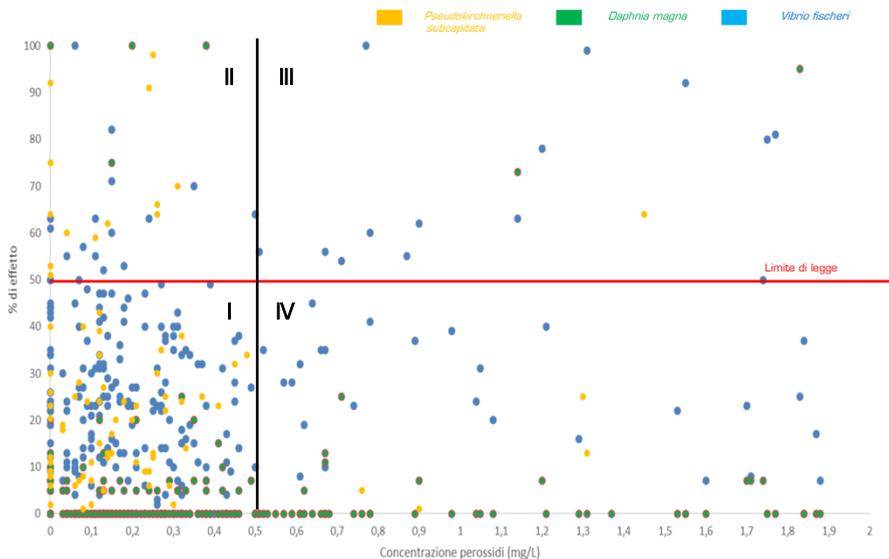


Figura 2. Percentuali di effetto in funzione della concentrazione di perossido rilevate nei campioni di acque di scarico analizzate dal 2013 al 2014 con due saggi di tossicità (*V.fischeri* e *D.magna*) e dal 2015 al primo semestre 2016 con la batteria di tre saggi.

### Conclusioni

I risultati mostrano una maggiore capacità dell'alga nell'individuare tossicità negli scarichi dei depuratori civili, seguita dal batterio luminescente. Questo dato concorda con quanto già evidenziato in

precedenti lavori (Aragno et al., 2014) e viene riconfermato anche con questa tipologia di disinfezione con PAA.

I valori di EC<sub>50</sub> mostrano una similitudine di sensibilità tra i batteri e l'alga (nonostante tempi diversi di esposizione), mentre per *D. magna* si ha una sensibilità inferiore di circa 5 volte.

Il confronto tra i dati di tossicità con le concentrazioni di perossido, ha permesso di ipotizzare un valore "soglia" di 0,5 mg/L che nell'ambito degli organismi indagati, minimizza il rischio di avere un effetto tossico indotto dall'utilizzo del disinfettante.

Ulteriori indagini sono necessarie per approfondire le conoscenze dell'impatto del PAA sull'ambiente con lo scopo finale di proporre un valore come «limite di legge» per l'utilizzo di questa sostanza per la disinfezione delle acque di scarico dei depuratori degli agglomerati urbani e non solo.

### ***Ringraziamenti***

Gli autori desiderano ringraziare i colleghi della sezione di chimica ambientale per l'esecuzione delle analisi chimiche.

### ***Bibliografia***

Aragno M., Cometto P., Beccaria T., Ghigo M., Vincenzi M., (2015). Batterie di saggi ecotossicologici: sintesi e prospettive dopo 13 anni di controlli ambientali in provincia di Cuneo. Atti 6° edizione Giornate di studio 11-13 novembre 2014. 147-151.

UNI EN 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.

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

UNI EN ISO 6341:2012. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta.

# APPLICAZIONE DI UNA BATTERIA DI TEST TOSSICOLOGICI PER LA VALUTAZIONE DI SEDIMENTI FLUVIALI DEL SIR SALINE ALENTO

by A. Arizzi Novelli <sup>a</sup>, M. Melchiorri <sup>a</sup>, E. Scamosci <sup>b</sup>, T. Marcelli <sup>c</sup>, N. Calace <sup>d</sup>, F. Onorati <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Arta Abruzzo Sezione BTA Distretto di Pescara - a.arizzi@artaabruzzo.it

<sup>b</sup>Arta Abruzzo Sezione CA Distretto di Pescara e.scamosci@artaabruzzo.it

<sup>c</sup> Arta Abruzzo Area Tecnica Sede Centrale t.marcelli@artaabruzzo.it

<sup>d</sup> ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale – nicoletta.calace@isprambiente.it – fulvio.onorati@isprambiente.it

---

**Abstract.** A seguito di una convenzione stipulata tra Regione Abruzzo, ISPRA e ARTA, il Sito di Interesse Regionale (SIR) Saline Alento è stato oggetto di una caratterizzazione integrativa definita sulla base dei risultati ottenuti dalla precedente indagine del 2009. In particolare sono state svolte analisi chimiche ed ecotossicologiche sui sedimenti dei Fiumi Saline e Alento. Al fine di valutare il pericolo ecotossicologico è stata impiegata una batteria di saggi biologici la cui costituzione ha tenuto conto della rappresentatività e della valenza ecologica degli organismi, in funzione dell'ambiente e della matrice da indagare (sedimento tal quale).

La batteria ha previsto l'utilizzo di un saggio cronico con *Heterocypris incongruens* (Crosteaceo Ostracode) applicato al sedimento tal quale e saggi acuti con *Daphnia magna* e *Pseudokirchneriella subcapitata* applicati all'elutriato. I risultati ottenuti hanno mostrato una diversa sensibilità degli organismi utilizzati, confermando la necessità di un approccio multi specie, e una relativa assenza di pericolo ecotossicologico.

Keywords: caratterizzazione, sedimenti fluviali, saggi di tossicità

## **Introduzione**

Il S.I.R. Saline Alento è stato oggetto di indagini integrative definite sulla base dei risultati ottenuti da una caratterizzazione preliminare condotta nel 2009.

A seguito di una convenzione stipulata nel 2014 tra Regione Abruzzo, ISPRA e ARTA, è stato implementato il piano di indagini focalizzando l'attenzione alle aree interessate da fenomeni di contaminazione per le quali è stato valutato anche il potenziale pericolo delle diverse matrici ambientali.

In generale, le indagini hanno riguardato: terreni che in precedenza avevano mostrato superamenti delle C.S.C.; aree interessate dalla presenza di rifiuti interrati; acque sotterranee; acque superficiali in corrispondenza dei medesimi punti di prelievo dei sedimenti fluviali;

sedimenti marini e arenili nelle aree che precedentemente avevano mostrato superamenti degli LCB di cui al manuale APAT-ICRAM (2007). Il presente lavoro riporta quanto previsto per la caratterizzazione dei sedimenti fluviali ed i risultati ottenuti da un approccio integrato chimico ed ecotossicologico. Nella Tab.1 sono riportati i parametri relativi alle analisi chimiche, granulometriche ed ecotossicologiche effettuate sui campioni di sedimenti fluviali.

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

La strategia di campionamento ha previsto un numero di stazioni di prelievo definite in funzione della idromorfologia dei corsi fluviali, ovvero lunghezza e larghezza del tratto di alveo da indagare. Per i tratti di alveo con larghezza compresa tra i 5 e 10 m, compatibilmente con l'accessibilità dei luoghi, sono stati prelevati 2 campioni di sedimento superficiale dello spessore di 0.3 m, per un totale di 26 campioni (22 per il Fiume Saline (STT) e 4 per il Fiume Alento (ATT). Essi sono stati analizzati come matrice "tal quale", mentre una seconda aliquota è stata trattata per la preparazione dell'elutriato, la cui analisi permette di valutare il livello di tossicità della frazione estraibile in acqua delle miscele di contaminanti presenti nel sedimento. Tale matrice, infatti, essendo ottenuta mediante un processo di "lavaggio" del sedimento, consente di valutare i potenziali effetti tossici sulle componenti biologiche sensibili della colonna d'acqua, simulando eventi di mobilizzazione, risospensione e rideposizione del sedimento.

La scelta della batteria di saggi tossicologici comprendente l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (test "acuto" con esposizione a matrice acquosa per 72 h), il crostaceo cladocero *Daphnia magna* (test "acuto" con esposizione a matrice acquosa per 24 h) e il crostaceo ostracode *Heterocypris incongruens* (test "cronico" con esposizione a sedimento tal quale per 6 giorni), ha tenuto conto di organismi appartenenti a diversi livelli trofici, della rappresentatività e valenza ecologica degli organismi in funzione dell'ambiente e delle matrici da indagare, ma anche della disponibilità di metodologie standardizzate (Manuale ISPRA 88/2013).

In laboratorio i campioni di sedimento sono stati conservati al buio a 4°C. La fase solida è stata analizzata entro breve tempo, mentre una seconda aliquota è stata trattata per la preparazione dell'elutriato. La metodica ha previsto un'estrazione in acqua con un rapporto sedimento:acqua di 1:4 calcolato sul peso secco con successiva agitazione della sospensione mediante Jar Test per 30' a 230 rpm e sedimentazione per 1 ora. Il surnatante è stato raccolto e congelato a -18°C sino all'esecuzione dei test di tossicità (EPA, 1991; Arizzi Novelli et al., 2006).

Il saggio di tossicità con l'alga *P. subcapitata* è stato eseguito utilizzando il kit commercialmente disponibile e facendo riferimento alla norma ISO 8692:2012. Le colture algali preparate in precedenza sono state esposte in fase di crescita esponenziale a diluizioni scalari dell'elutriato (12.5%, 25%, 50% 75% e 100%), preparato in 3 repliche miscelando appropriate quantità del mezzo di crescita con la soluzione acquosa da analizzare. Gli organismi sono stati incubati per un periodo di 72 ± 2h al termine del quale sono stati fissati per permettere la lettura, eseguita mediante un contatore di cellule del tipo Beckman Coulter.

Per quanto riguarda *D. magna*, sono stati utilizzati organismi ottenuti dalla schiusa di epipi utilizzando il kit commercialmente disponibile e facendo riferimento alla norma UNI EN ISO 6341:2012. Una volta ottenuti organismi della stessa età dopo la fase di schiusa di 72h a temperatura e luce costanti ( $20 \pm 1$  h e 6000 lux), si è proceduto all'esposizione al buio per 24 h a diluizioni scalari del campione acquoso in 3 repliche (12.5%, 25%, 50%, 75% e 100%). Alla termine della esposizione si è proceduto alla conta degli organismi immobilizzati rispetto al controllo (acqua di diluizione) finalizzata alla stima della IC50 (concentrazione di immobilizzazione) dopo 24 h di esposizione mediante il metodo Spearman-Kärber.

Nel saggio con *H. incongruens*, che fa riferimento alla norma ISO 14371:2012, neonati ottenuti dalla schiusa di cisti sono stati esposti direttamente al campione di sedimento in 6 repliche e per 6 giorni a  $25 \pm 1$  °C al buio. L'endpoint misurato è la mortalità registrata rispetto ad un sedimento artificiale utilizzato come controllo negativo. Nel caso al termine del saggio la mortalità sia inferiore al 30%, il metodo prevede come endpoint l'inibizione della crescita sulla base della lunghezza dei sopravvissuti misurata allo stereomicroscopio. Anche per questo saggio la norma è compatibile con l'uso di un kit commercialmente disponibile.

*Tabella 1. Parametri chimico-fisici ed ecotossicologici selezionati per l'analisi dei sedimenti fluviali*

Parametri chimico-fisici	Parametri ecotossicologici
Zn	Alga <i>Pseudokirchneriella</i>
Pb	<i>subcapitata</i>
Cu	Crostaceo cladocero <i>Daphnia</i>
Benzene	<i>magna</i>
PCB	Crostaceo ostracode <i>Heterocypris</i>
Idrocarburi leggeri (C <sub>&lt;12</sub> )	<i>incongruens</i>
Idrocarburi pesanti (C <sub>&gt;12</sub> )	
pH	
TOC	
Granulometria	

## **Risultati**

Per quanto riguarda i saggi di tossicità, i risultati ottenuti con i tre diversi organismi vengono riportati nelle Figg. 1 e 2.

Il test algale non ha riscontrato effetti tossici significativi ( $p > 0,05$  al 95% di significatività tramite t-test con varianza disomogenea), ma solo modesti fenomeni di biostimolazione, per la quasi totalità dei campioni, da ritenere tuttavia non rilevanti biologicamente.

Anche il saggio con il cladocero non ha mostrato alcun effetto di tossicità statisticamente significativo, in quanto l'immobilizzazione è stata nulla o estremamente ridotta in tutte le repliche dei campioni analizzati rispetto al controllo ( $p > 0,05$  al 95% di significatività statistica).

Con il saggio cronico effettuato con l'ostracode applicato al sedimento tal quale, è stato osservato un effetto massimo pari al 30% di mortalità per il solo campione STT10A. La stima della percentuale di inibizione della

crescita ha invece evidenziato per circa la metà dei campioni di sedimento di entrambi i fiumi, un decremento compreso tra il 30 ed il 40%, raggiungendo il 70 e il 73% nelle stazioni STT2A e STT10A, rispettivamente. Gli effetti subletali di inibizione della crescita sono ritenuti biologicamente rilevanti, sebbene non associabili direttamente alle concentrazioni delle sostanze chimiche ricercate.

Infatti, i risultati delle analisi chimiche non hanno evidenziato valori di superamento per nessuno dei parametri chimici indagati nei campioni di sedimento sia del fiume Saline che Alento (Tab. 2).

I risultati delle analisi granulometriche hanno evidenziato che circa il 65% dei campioni di sedimento di entrambi i fiumi presenta una predominanza della frazione pelitica.

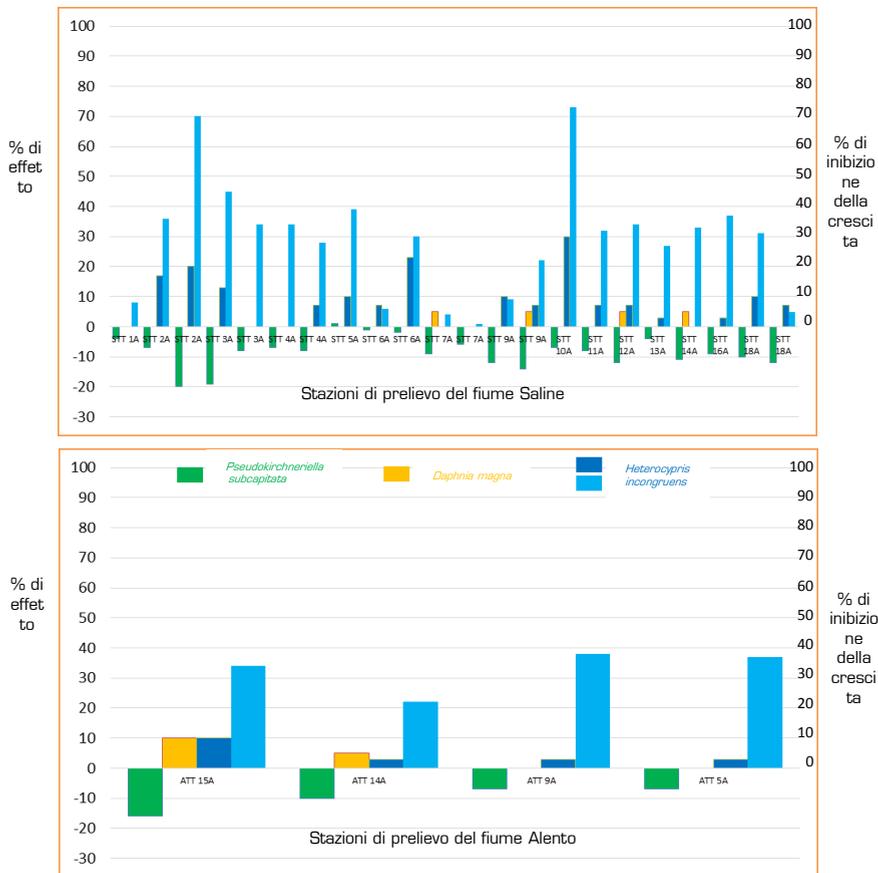


Figure 1 e 2. Risultati delle analisi ecotossicologiche effettuate sui sedimenti del fiume Saline e del fiume Alento.

*Tabella 2. Risultati delle analisi chimiche (espressi in mg/kg s.s.) effettuate sui sedimenti del fiume Saline (da STT1A a STT18A) e del fiume Alento (ATT15A, ATT14A, ATT9A e ATT5A).*

Comune	Stazioni Prelievo	C ≤12	C >12	Benzene	PCB Totali	Zinco	Piombo	Rame
MONTESILVANO	STT1A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	1,9	9,2	7,1	3
MONTESILVANO	STT2A (0-10cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	5,4	54	14	15
MONTESILVANO	STT2A (0-10cm)	< 0,5	21	< 0,01	4,7	55	13	15
MONTESILVANO	STT3A (0-10cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	4,2	38	11	9
CITTÀ' S.ANGELO	STT3A (0-10cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	2,9	54	15	13
MONTESILVANO	STT4A (0-10cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	4,5	54	15	15
CITTÀ' S.ANGELO	STT4A (0-10cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	2	56	14	16
MONTESILVANO	STT5A (0-5cm)	< 0,5	21	< 0,01	1,7	66	18	21
MONTESILVANO	STT6A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	1,5	41	15	11
MONTESILVANO	STT6A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	2,3	47	16	13
MONTESILVANO	STT7A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	2	64	24	20
CITTÀ' S.ANGELO	STT7A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	<1,0	33	19	8,7
CITTÀ' S.ANGELO	STT9A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	<1,0	20	12	7,1
MONTESILVANO	STT9A (0-5 cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	<1,0	23	10	7,4
CAPPELLE SUL TAVO	STT10A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	1,1	34	9,6	10
COLLECORVINO	STT11A	< 0,5	< 10	< 0,01	2,4	64	16	18
MOSCUFO	STT12A	< 0,5	< 10	< 0,01	1,1	16	6,4	5,4
COLLECORVINO	STT13A	< 0,5	< 10	< 0,01	1	62	17	16
CITTÀ' S.ANGELO	STT14A (0-5cm)	< 0,5	12	< 0,01	<1,0	36	11	16
CITTÀ' S.ANGELO	STT16A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	<1,0	30	14	9,5
CITTÀ' S.ANGELO	STT18A (0-5 cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	<1,0	26	10	10
CITTÀ' S.ANGELO	STT18A (0-5 cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	<1,0	54	16	15
RIPA TEATINA	ATT15A ( 0-20cm)	< 0,5	29	< 0,01	4,2	59	16	18
RIPA TEATINA	ATT14A (0- 20cm)	< 0,5	31	< 0,01	6,7	65	15	23
TORREVECCHIA TEATINA	ATT9A (0-5cm)	< 0,5	< 10	< 0,01	1,3	24	12	12
FRANCAVILLA AL M.	ATT5A (0-5cm)	< 0,5	23	< 0,01	3	79	19	42

## ***Conclusioni***

I risultati ottenuti dall'applicazione della batteria di saggi biologici hanno evidenziato una sensibilità degli organismi utilizzati piuttosto diversa, confermando la necessità di un approccio multispecie.

I sedimenti relativi sia al Fiume Saline che al Fiume Alento non hanno determinato risposte tossiche né acute né croniche per quanto riguarda la mortalità/sopravvivenza; analogamente il tasso di crescita dell'alga non ha mostrato variazioni significative.

La crescita dell'ostracode, probabilmente da considerare la componente più sensibile della batteria di saggi impiegata, ha evidenziato invece, effetti importanti su buona parte dei campioni analizzati.

Sulla base dei dati disponibili non risulta possibile l'applicazione di alcuna procedura per la derivazione su base statistica di valori chimici di riferimento, come ad esempio secondo quanto previsto dal D.D. 8 giugno 2016, a causa della relativa omogeneità dei dati chimici ed ecotossicologici che non consentono di discriminare differenti livelli di pericolo chimico associabili alle classe di tossicità.

Tuttavia, ciò suggerisce anche che la situazione ambientale complessiva non sia particolarmente compromessa, sia per i valori assoluti di concentrazione dei contaminanti ricercati sia per la sostanziale assenza di tossicità che ha permesso di escludere un pericolo attuale nei confronti del biota.

## ***Ringraziamenti***

Gli autori desiderano ringraziare, la sezione di chimica ambientale per l'esecuzione delle analisi chimiche e granulometriche e l'area tecnica per la collaborazione fornita.

## ***Bibliografia***

APAT ICRAM (2007) Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini.

Arizzi Novelli A., Losso C., Libralato G., Tagliapietra D., Pantani C. and Volpi Ghirardini A. (2006). Is the 1:4 elutriation ratio affordable? Ecotoxicological comparison of four different sediment: water proportions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 306-313.

ISO 14371:2012 Water Quality - Determination of fresh water sediment chronic toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda)

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

ISPRA (2013). Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne. Manuali e Linee Guida 88/2013.

UNI EN ISO 6341:2012. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta

US EPA/US Army Corps of Engineers (1991) Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal (testing manual). EPA 503/8-91/001.

# EFFETTI DELLA CAFFEINA SULLO SVILUPPO EMBRIONALE DI ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

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

<sup>a</sup> Istituto Superiore di Sanità – Dip. Ambiente e Salute (Italy) – [ines.lacchetti@iss.it](mailto:ines.lacchetti@iss.it)

<sup>b</sup> Istituto Superiore di Sanità – Dip. Ambiente e Salute (Italy) – [paola.gucci@iss.it](mailto:paola.gucci@iss.it)

<sup>c</sup> RWTH Aachen University (Germany) – [carolina.dipaolo@bio5.rwth-aachen.de](mailto:carolina.dipaolo@bio5.rwth-aachen.de)

<sup>d</sup> Istituto Superiore di Sanità – Dip. Ambiente e Salute (Italy) – [mario.carere@iss.it](mailto:mario.carere@iss.it)

---

**Abstract** – La caffeina è un alcaloide diffusamente utilizzato nei farmaci per le sue azioni stimolanti e broncodilatatorie, ampiamente introdotto nella dieta come costituente di bevande energetiche, tè e caffè. A causa del consumo sempre più elevato, la caffeina è stata riconosciuta come contaminante emergente dei sistemi idrici di acqua dolce e marini. Anche se presente a concentrazioni molto basse, essa è considerata, inoltre, un tracciante antropico ambientale utile per la valutazione dell'efficacia degli impianti di depurazione.

Il presente studio ha voluto indagare gli effetti della caffeina, a diverse concentrazioni, su organismi acquatici quali potenziali bersagli. In particolare si riportano i risultati preliminari ottenuti sugli embrioni di pesce *Danio rerio* e su *Daphnia magna*.

Keywords: Caffeina, FET, *Danio rerio*, *Daphnia magna*, contaminanti emergenti

## Introduzione

La caffeina, 1,3,7-trimetilxantina, è una sostanza appartenente alla famiglia degli alcaloidi presenti in foglie, semi e frutti di diverse piante dove agisce come insetticida naturale, con effetto tossico per insetti e altri artropodi che se ne nutrono.

La caffeina viene ampiamente utilizzata per le sue azioni stimolanti e broncodilatatorie in bevande come tè, caffè, in bevande energizzanti a base di cola e in prodotti erboristici come il guaranà. Il consumo globale di caffè, secondo la FAO, ha raggiunto nel 2015 circa 9 milioni di tonnellate e pertanto è stata riconosciuta come sostanza stimolante più popolare e ampiamente utilizzata dall'uomo (Lawrence et al., 2005). La caffeina, inoltre, viene impiegata anche nella preparazione di prodotti cosmetici anticellulite e in molti farmaci da banco analgesici o per il raffreddamento. Il suo metabolismo è stato dimostrato essere qualitativamente simile negli animali e nell'uomo (Arnaud, 1987). La principale via enzimatica nell'uomo procede attraverso la formazione della paraxantina, farmaco biologicamente attivo, che porta alla produzione di metaboliti; questi

vengono escreti con l'urina, raggiungendo così il sistema delle acque reflue.

A causa del suo abbondante impiego, la presenza della caffeina è stata rilevata, se pure a basse concentrazioni, anche nell'ambiente, in particolare in quello acquatico, ascrivendola come contaminante emergente nei sistemi idrici sia d'acqua dolce che marini. In una recente *review* vengono riportate le concentrazioni ambientali di prodotti farmacologici presenti in letteratura, in particolare per la caffeina in Europa vengono registrati valori tra i 300 e i 4500 ng/L per gli effluenti e per le acque sotterranee (Kolpin et al., 2002; Li, 2014).

La caffeina, contrariamente ad altri farmaci, sebbene sia un composto altamente biodegradabile, con un'emivita di 1,5 giorni (Lam et al., 2004), è stata descritta tra i rifiuti organici più comuni nelle acque naturali (Capolupo et al., 2016), tanto da essere utilizzata come tracciante di contaminazione antropica residua nei terreni e nelle acque superficiali. E' da sottolineare, inoltre, che gli apporti di caffeina dagli impianti di depurazione ai corsi d'acqua naturali sono in funzione sia del numero della popolazione a cui si riferisce l'impianto, sia del consumo, sia del tipo di trattamento impiegato; ad esempio per impianti che utilizzano il trattamento biologico si registrano valori di efficienza di rimozione della caffeina intorno al 90%, mentre per impianti che non utilizzano tale trattamento i valori di rimozione sono molto bassi, intorno al 10% (Buerge et al., 2003; Weigel et al., 2004).

Il presente studio ha voluto indagare gli effetti acuti della caffeina sugli organismi acquatici, quali potenziali bersagli, in particolare su embrioni di pesce *Danio rerio*, (*zebrafish*) anche attraverso l'osservazione delle eventuali anomalie nello sviluppo (effetti subletali) prevista dall'OECD 236 «Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test».

È stata valutata, inoltre, la sensibilità del test con *Danio rerio* tramite il confronto con *Daphnia magna*, quale test convenzionale principalmente richiesto dalle normative nel settore ambientale. *Zebrafish* e *Daphnia*, per di più, vengono proposti insieme come modello eccellente di sistema di allerta per la tossicità acquatica (Martins et al., 2007).

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

Per la sperimentazione è stata utilizzata caffeina in polvere (C0750 Sigma-Aldrich) sciolta in *standard freshwater* per la preparazione di sei concentrazioni: 1 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L.

*Danio rerio* e *Daphnia magna* sono stati esposti alle sei concentrazioni per valutare gli effetti e la sensibilità dei due test alla caffeina.

#### *Fish Embryo Acute Toxicity (Fet) Test – OECD 236/2013*

Il principio del FET si basa sull'esposizione di singole uova della specie ittica *Danio rerio* poste in piastre da 24 pozzetti per valutare l'eventuale tossicità acuta del campione. Il test, che deve iniziare entro 90 minuti dalla fecondazione delle uova, è stato allestito in doppio in piastre multipozzetto, contenenti 20 uova per ciascuna delle sei concentrazioni di caffeina. Le piastre sono state incubate a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  con ciclo luce-buio per 96 ore.

Eventuali malformazioni dell'embrione sono state 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) **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) **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.

Sono previsti l'allestimento di un controllo negativo costituito da *standard freshwater* e uno positivo con il tossico di riferimento 3,4-dicloroanilina (3,4 DCA) alla concentrazione di 4 mg/L, a conferma dell'idoneità degli organismi utilizzati.

Al termine del periodo di esposizione, la tossicità acuta è stata determinata sulla base di un risultato positivo di una delle quattro osservazioni apicali registrate, ed espressa come EC50.

#### *Daphnia magna* – OECD 202/2004

Per quanto concerne il saggio di immobilizzazione con *Daphnia magna*, un totale di 20 dafnidi sono stati esposti in doppio per ciascuna delle sei concentrazioni di caffeina. Le piastre allestite per le prove sono state incubate a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  al buio per un periodo di 48 ore. È stata effettuata, come previsto dal saggio, una prova con il tossico di riferimento bicromato di potassio a conferma dell'idoneità degli organismi utilizzati. I dati di immobilità degli organismi sono stati registrati a 24 ore e 48 ore e confrontati con i valori ottenuti con il controllo negativo. I risultati sono riportati come EC50.

#### **Risultati**

Il saggio con zebrafish (FET) in relazione all'osservazione dei quattro endpoint ha permesso di evidenziare effetti acuti significativi sugli embrioni di *Danio rerio* a concentrazioni di caffeina maggiori di 250 mg/L con un valore di mortalità del 25%. Il valore di EC50 calcolato è stato pari a 626,3 mg/L (Tabella 1). Parallelamente sono stati registrati diversi effetti subletali quali edema e deformità, in particolare a livello caudale (Figura 1), già a partire dalla concentrazione di 10mg/L.

Tabella 1. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test - risultati espressi come percentuali di mortalità e deformità degli embrioni misurati durante le 96 ore di esposizione.

FET ( <i>Danio rerio</i> )	Mortalità				Deformità
	24h	48h	72h	96h	96h
1 mg/L	0	0	0	0	0
10 mg/L	0	0	0	0	10%
100 mg/L	10%	10%	10%	10%	94%
250 mg/L	25%	25%	25%	25%	100%
500 mg/L	30%	35%	35%	35%	100%
1000 mg/L	100%	100%	100%	100%	-

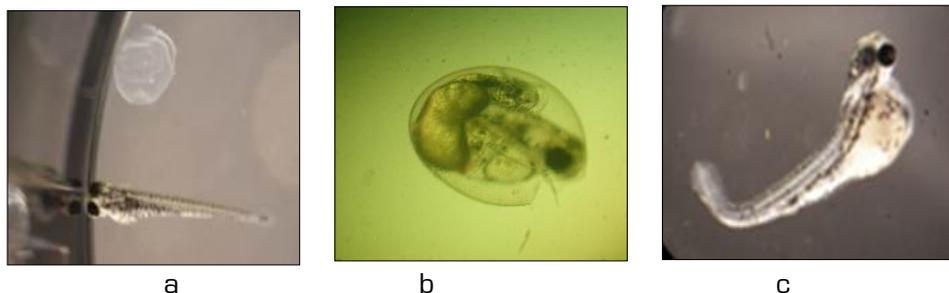


Figura 1. Foto di embrioni di *Danio rerio* a 96h: (a) sviluppo normale; (b) ritardo nello sviluppo e crescita deforme; (c) deformità a livello caudale

Il test acuto con *Daphnia magna* ha evidenziato, invece, una tossicità acuta significativa solo alla concentrazione più elevata di caffeina (1000 mg/L) (Tabella 2) con una EC50 estrapolata di 777,5 mg/L.

Tabella 2. *Daphnia magna* - Risultati espressi come percentuali di mortalità dei dafnidi a 24 e 48 ore di esposizione.

<i>Daphnia magna</i>	Immobilità	
	24h	48h
1 mg/L	0	0%
10 mg/L	0	0%
100 mg/L	0	0%
250 mg/L	5%	10%
500 mg/L	10%	15%
1000 mg/L	45%	100%

## ***Discussione e Conclusioni***

L'interesse sugli effetti che i contaminanti emergenti presenti nell'ambiente possano svolgere sugli organismi acquatici è sempre più insistente. Tuttavia le valutazioni ecotossicologiche condotte attraverso test di tossicità acuta convenzionali si sono rivelate spesso poco sensibili (Moore et al., 2008), come confermato, peraltro, dai primi risultati del nostro studio.

Va comunque sottolineato che gli embrioni di *Danio rerio* sono risultati più sensibili di *Daphnia magna*, come peraltro evidenziato dai valori di EC50 calcolati.

Un risultato interessante, si evince dall'osservazione degli effetti di tossicità subletale per il FET. La caffeina, infatti, ha determinato diversi effetti subletali sull'embrione di *Danio rerio*: deformità nel tratto caudale (scoliosi), edema addominale, ritardo nella schiusa, riduzione della lunghezza della coda, come peraltro riscontrato in altri studi (Selderslaghsa et al., 2009). Queste deformità, inoltre, sono risultate correlate direttamente con le concentrazioni di caffeina saggiate.

Lo studio ha contribuito ad implementare la conoscenza degli effetti acuti della caffeina sugli organismi acquatici quali principali bersagli ambientali. Ha evidenziato, inoltre, le potenzialità e l'efficacia del FET anche nell'ambito dei monitoraggi ambientali dei contaminanti emergenti, come un valido *effect based tool* a conferma di quanto già riportato nel Technical Report (Wernersson et al., 2015).

In conclusione, sebbene le concentrazioni di caffeina nell'ambiente non sembrano esercitare una tossicità acuta rilevante per gli organismi acquatici, non sono, comunque da escludere potenziali effetti subletali connessi all'esposizione cronica alla caffeina. Thomas e Foster (2005), infatti, sostengono che anche un farmaco velocemente degradabile, quale la caffeina, può agire come una sostanza chimica persistente. Se la caffeina viene abbondantemente scaricata da fonti antropogeniche in un ambiente, si potrebbero costantemente ricostituire i suoi livelli, indipendentemente dalla quantità di caffeina degradata, creando un equilibrio dinamico. In questa ottica gli studi ecotossicologici futuri potrebbero includere i potenziali effetti sinergici, della caffeina con i principali contaminanti emergenti come farmaci e pesticidi.

## ***Bibliografia***

Arnaud MJ 1987. The pharmacology of caffeine. Progress in drug research 31: 273-313.

Buerge IJ, Poiger T, Muller MD, Buser HR 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. Environ Sci Technol 37: 691-700.

Capolupo M, Valbonesi P, Kiwan A, Buratti S, Franzellitti S, Fabbri E 2016. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Science of the Total Environment 563-564: 538-548.

Kolpin D, Furlong D, Meyer M, Michaelthurman E, Zaugg S, Barber L, Buxton HT 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic

Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36: 1202-1211.

Lam MW, Young CJ, Brain RA, Johnson DJ, Hanson MA, Wilson CJ, Richards SM, Solomon KR, Mabury SA 2004. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ Toxicol Chem* 23: 1431-1440.

Lawrence JR, Swerhone GDW, Wassenaar LI, Neu TR 2005. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Can J Microbiol* 51: 655-659.

Li WC 2014. Occurrence and concentration of pharmaceuticals found in effluent, freshwater and groundwater from America, Europe and Asia. *Environmental Pollution* 187: 193-201.

Martins JC, Teles LO, Vasconcelos V 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International* 33: 414-425.

Moore MT, Greenway SL, Farris JL, Guerra B 2008. Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. *Arch Environ Contam Toxicol* 54: 31-35.

OECD 2004. Guidelines for the testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test and Reproduction test. Guideline 202.

OECD 2013. Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Guideline 236.

Sauvé S, Aboufadi K, Dorner S, Payment P, Deschamps G, Prévost M 2012. Fecal coliforms, caffeine and carbamazepine in stormwater collection systems in a large urban area. *Chemosphere* 86(2): 118-123.

Selderslaghsa IWT, Van Rompaya AR, De Coenb W, Wittersa HE 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology* 28: 308-320.

Thomas PM, Foster GD 2005. Tracking acidic pharmaceuticals, caffeine, and triclosan through the wastewater treatment process. *Environ Toxicol Chem* 24: 25-30.

Weigel S, Berger U, Jensen E, Kallenborn R, Thoresen H, Huhnerfuss H 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56: 583-592.

Wernersson A S, Carere M, Maggi C, Tusil P, Polesello S, Lacchetti I, et al. 2015. The European Technical Report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 03, 27(7).

# VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA DI UN AMBIENTE MARINO-COSTIERO: CASO STUDIO

by I. Lacchetti<sup>a</sup>, P. M. B. Gucci<sup>b</sup>, M. Carere<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Istituto Superiore di Sanità – Dipartimento Ambiente e Salute – ines.lacchetti@iss.it

<sup>b</sup> Istituto Superiore di Sanità – Dipartimento Ambiente e Salute – paola.gucci@iss.it

<sup>c</sup> Istituto Superiore di Sanità – Dipartimento Ambiente e Salute – mario.carere@iss.it

---

**Abstract** - L'area oggetto di questo studio include un tratto di litorale marino-costiero del mare Tirreno caratterizzato da una intensa attività industriale e portuale.

Lo studio ecotossicologico che viene qui riportato fa parte di uno studio più ampio e articolato che ha l'obiettivo generale di valutare l'impatto delle attività industriali sulla qualità chimica delle acque e dei sedimenti nel tratto marino-costiero preso in considerazione.

A supporto dell'analisi chimica, infatti, al fine di ottenere maggiori informazioni sulla qualità complessiva di acqua e sedimenti, per alcuni campioni sono stati effettuati anche saggi ecotossicologici su alcuni livelli della catena trofica, così come previsto dalla normativa vigente.

Gli effetti ecotossicologici sono stati, pertanto, valutati attraverso l'esecuzione di saggi su due specie di crostacei, *Artemia franciscana* e *Tigriopus fulvus*, e sulla diatomea marina *Phaeodactylum tricurnutum*; i biosaggi sono stati effettuati sui campioni di elutriato dei sedimenti. L'esecuzione del saggio algale ha esibito risposte più significative rispetto ai saggi con i crostacei; tra i due crostacei *Artemia franciscana* si è dimostrata più sensibile rispetto a *Tigriopus fulvus*.

Keywords: saggi ecotossicologici, *Artemia franciscana*, *Tigriopus fulvus*, *Phaeodactylum tricurnutum*, qualità dei sedimenti.

## Introduzione

L'Italia, grazie alla sua conformazione geografica, ha da sempre concentrato le sue principali attività produttive, economiche e turistiche in prevalenza lungo le coste che si estendono per circa 8000 km. Nel corso del tempo, pertanto, si è venuto a verificare un graduale deterioramento di tali aree soggette all'intenso sfruttamento ad opera prevalentemente delle crescenti attività industriali e portuali, compromettendo in tal modo anche la qualità dei fondali antistanti. Nei sedimenti, infatti, si riversano e si accumulano i contaminanti prodotti dalle diverse attività antropiche ed è per questo che essi possono essere considerati i ricettori finali del trasferimento dei contaminanti nell'ambiente e la loro qualità diviene indice dello stato di salute delle aree circostanti. La gestione dei sedimenti nelle aree costiere ed in particolare nei bacini portuali rappresenta, pertanto,

una problematica di grande rilevanza e attualità non solo in Italia ma anche in molti altri Paesi (Giaime et al., 2016).

Per poter formulare un giudizio complessivo ed esaustivo sulla qualità dei sedimenti sarebbe più idoneo affiancare le analisi ecotossicologiche alla caratterizzazione chimica e fisica dei sedimenti stessi come ormai evidenziato nell'ambito delle attività per l'implementazione della Direttiva Quadro Acque e della Strategia Marina Comunitaria (European Union, 2000; Wernersson et al., 2015).

Lo studio a livello ecotossicologico che viene riportato in questo lavoro fa parte, infatti, di uno studio molto più ampio e complesso che ha come obiettivo principale quello di valutare l'influenza delle attività industriali e portuali, presenti nel tratto di mare in indagine, sulla qualità delle acque e dei sedimenti.

### *Area di studio*

Lo studio è stato condotto su un tratto di litorale marino-costiero del mare Tirreno centrale, comprendente l'area vasta del comune di Civitavecchia e dei comuni ad essa limitrofi, caratterizzato da un' elevata attività industriale e portuale. Nell'area insistono, tra l'altro, due centrali termoelettriche, un cementificio ed un porto navale, importante sia per il trasporto delle merci che come porto turistico.

Lo scopo di questo studio è stato la valutazione dell'impatto di tali attività insistenti sull'area attraverso lo svolgimento di una indagine ecotossicologica preliminare condotta sui sedimenti. Tali risultati saranno successivamente integrati con quelli prodotti nella valutazione chimica tutt'ora in corso.

### *Materiali e metodi*

Sono stati analizzati 5 campioni di sedimento ubicati lungo il tratto di litorale marino-costiero a distanze variabili dalla costa e all'interno delle saline di Tarquinia.

Gli effetti ecotossicologici sono stati valutati attraverso l'esecuzione di saggi su due specie di crostacei, *Artemia franciscana* e *Tigriopus fulvus*, e sull'alga marina *Phaeodactylum tricurnutum*.

La scelta dei due crostacei è stata motivata dal fatto che a queste specie si fa riferimento in diverse normative di settore, esse sono inserite, infatti, tra le specie utilizzabili indicate per indagini ecotossicologiche dalla Regione Veneto (D.G.R., 2005), dalla Legge Regionale Toscana 4 aprile 2003, n. 19, (L. R., 2003), dalla Provincia di Livorno Dipartimento dell'Ambiente e del Territorio (Regolamento Provinciale, 2009) e dalle procedure operative per la movimentazione di materiali in ambiente marino o in zone ad esso contigue dell'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana (ARPAT, 2005); inoltre questi test sono stati inseriti tra quelli d'obbligo da impiegare per la valutazione di idoneità dei prodotti assorbenti e disperdenti da impiegare in mare per la bonifica dalla contaminazione da idrocarburi petroliferi (Italia, 2011 – All. 4).

*Phaeodactylum tricurnutum* è un'alga marina planctonica appartenente al *Phylum Bacillariophyta* ed è una diatomea ampiamente diffusa sia nelle acque costiere che estuarine. E' stato dimostrato essere un organismo sensibile all'esposizione agli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e ai

metalli (Scarano e Morelli, 1999; Morelli e Scarano, 2001, 2004; Wei et al., 2014).

#### *Preparazione dell'elutriato*

L'esecuzione dei biosaggi è stata effettuata sull'elutriato dei sedimenti. Gli elutriati sono stati ottenuti aggiungendo acqua demineralizzata al sedimento in rapporto 4 : 1 (ml : mg<sub>ss</sub>), posti in agitazione su piastra rotante alla velocità di 300 rpm per 24 ore. Prima dell'esecuzione dei tre saggi, il surnatante è stato filtrato su membrane con porosità di 0,45 µm.

#### *Analisi ecotossicologiche*

Il saggio con *Artemia franciscana* è stato effettuato seguendo le linee guida APAT-IRSA-CNR (APAT, 2003).

Per il test acuto con *Tigriopus fulvus* è stato utilizzato il metodo standardizzato e riconosciuto nel 2014 dalla UNICHIM (UNICHIM, 2014).

La procedura di riferimento utilizzata per il saggio di crescita con *Phaeodactylum tricornutum* è la norma ISO 10253/2006 (ISO, 2006).

Per tutti e tre i saggi sono sempre state effettuate tre repliche per ciascun campione. Parallelamente alle analisi sui campioni ambientali è stato condotto un controllo negativo, rappresentato da acqua di mare artificiale, e un controllo positivo, rappresentato da una sostanza tossica ad effetto noto.

#### *Risultati*

Le percentuali di mortalità ottenute per i campioni di sedimento analizzati con il saggio che utilizza *Artemia franciscana* sono riportati in Tabella 1, vengono, inoltre, riportati i valori medi degli organismi morti e la deviazione standard.

*Tabella 1. Risultati del saggio con Artemia franciscana espressi come percentuali di mortalità*

CAMPIONI	MEDIA Organismi morti	DEVIAZIONE STANDARD	MORTALITÀ %
Controllo	0	0	0
C 1	1,00	0	10
C 2	1,67	0,58	16,7
C 3	1,00	0	10
C 4	1,00	0	10
C 5	1,33	0,47	13,3

In Tabella 2 vengono riportati i risultati del test con l'alga *Phaeodactylum tricornutum*, espressi come percentuali di inibizione di crescita, nonché i valori medi delle cellule algali contate e relativa deviazione standard.

I risultati relativi al saggio con *Tigriopus fulvus* non vengono presentati in una tabella dato che tutti i campioni di sedimento analizzati hanno dato esito negativo, ossia sono tutti risultati non tossici.

*Tabella 2. Risultati del saggio con Phaeodactylum tricornutum espressi come percentuali di inibizione di crescita*

CAMPIONI	MEDIA Cell x 10 <sup>3</sup> /mL	DEVIAZIONE STANDARD	INIBIZIONE CRESCITA %
Controllo	1030	49,7	0
C 1	1063	205,0	0
C 2	353	20,8	23
C 3	1030	60,8	0
C 4	1083	133,0	0
C 5	848	57,9	4

### **Discussione**

Dai risultati ottenuti si può osservare che gli elutriati dei sedimenti non hanno mostrato effetti tossici rilevanti. L'esecuzione del saggio con *Phaeodactylum tricornutum* ha esibito, tuttavia, risposte più significative rispetto ai saggi con i crostacei, soprattutto per il campione C 2 (saline di Tarquinia), per il quale è stata registrata una percentuale di inibizione di crescita pari al 23%.

Tra i due crostacei *Artemia franciscana* si è dimostrata più sensibile rispetto a *Tigriopus fulvus*, infatti, rispetto a quest'ultimo nessun campione ha mostrato tossicità, mentre con *Artemia franciscana* si è registrata una debole tossicità per i campioni C 2 e C 5, pari al 16,7% e al 13,3%, rispettivamente; la percentuale di mortalità del 10% non si può considerare di effetto poiché rientra nella validità del metodo per il controllo.

Dato che il campione di sedimenti C 2 ha mostrato un segnale di tossicità, sebbene non elevato, sia sull'alga *P. tricornutum* che sul crostaceo *A. franciscana*, è stato analizzato un campione aggiuntivo della colonna d'acqua, prelevato nello stesso sito di campionamento. Tale campione ha evidenziato una tossicità elevata sull'alga, con un valore medio di inibizione di crescita pari al 60%.

### **Conclusioni**

Le analisi ecotossicologiche hanno evidenziato, sia negli elutriati di sedimento che nella colonna d'acqua, degli effetti sull'alga *Phaeodactylum tricornutum* che, come noto in letteratura, risente dell'esposizione a IPA e a diversi metalli pesanti come rame, piombo, cadmio e zinco (Scarano e Morelli, 1999; Morelli e Scarano, 2001; Wei et al., 2014).

Le risultanze preliminari delle analisi chimiche, oggetto di uno studio più ampio e integrativo, hanno del resto rilevato una contaminazione di alcuni metalli pesanti, potenzialmente correlabile all'effetto che è stato registrato sull'alga. Si può evidenziare, pertanto, l'importanza della scelta degli organismi target nella batteria di saggi per la valutazione della qualità dei sedimenti.

Occorrerebbero, tuttavia, analisi ecotossicologiche più approfondite, utilizzando altresì saggi "in vitro" ed ulteriori saggi "in vivo" per poter approfondire gli effetti potenziali anche additivi causati dalla presenza delle numerose sostanze chimiche presenti.

### ***Bibliografia***

APAT 2003. Metodi analitici per le acque Vol. 3 – Metodi Ecotossicologici 8060 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Artemia sp.* Manuali e Linee Guida 29/2003.

ARPAT 2005. Movimentazione materiali in ambiente marino o in zone ad esso contigue - Procedura operativa. Giugno 2005.

Deliberazione della Giunta Regionale 30 dicembre 2005, n. 4170 - Direttive tecniche per la caratterizzazione e valutazione di compatibilità delle sabbie destinate al ripascimento dei litorali nella regione del Veneto. Legge 31 luglio 2002, n. 179.

European Union. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off J Eur Union. 2000; L 327:1-73.

Giaime F, Onorati F, Sprovieri M, Quinci E M, Ferrara F, Carere M 2016. La gestione dei sedimenti marini: verso un percorso univoco di valutazione della qualità nei nuovi disposti normativi. *Ingegneria dell'Ambiente* 3(4): 295-306.

Italia, 2011. Decreto Ministeriale 25 febbraio 2011. Definizioni delle procedure per il riconoscimento di idoneità dei prodotti assorbenti e disperdenti da impiegare in mare per la bonifica dalla contaminazione da idrocarburi petroliferi. (11A03807). *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 74 del 31-3-2011 - Suppl. Ordinario n. 87. Allegato 4 Metodologie analitiche e criteri di accettabilità delle risultanze dei test necessari per il riconoscimento di idoneità dei prodotti assorbenti di origine sintetica o naturale non inerti.

ISO 10253:2006. Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.

Legge Regionale Toscana 4 aprile 2003, n. 19 - Disposizioni in materia di tutela della fascia costiera e di inquinamento delle acque. Modifica alla legge regionale 1 dicembre 1998, n. 88 (Attribuzione agli Enti locali e disciplina generale delle funzioni amministrative e dei compiti in materia di urbanistica e pianificazione territoriale, protezione della natura e dell'ambiente, tutela dell'ambiente dagli inquinamenti e gestione dei rifiuti, risorse idriche e difesa del suolo, energia e risorse geotermiche, opere pubbliche, viabilità e trasporti conferite alla Regione dal D. Lgs. 31 marzo 1998, n. 112). *Bollettino Ufficiale della Regione Toscana* del 9 aprile 2003 n. 17.

Morelli E, Scarano G 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Environmental Research* 52(4): 383-395.

Morelli E, Scarano G 2004. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci* 16:7289-7296.

Regolamento Provinciale per la gestione dei procedimenti di cui alla Legge Regionale Toscana 4 aprile 2003, n. 19 "Movimentazione Sedimenti Marini", marzo 2009.

Scarano G, Morelli E 1999. Binding of Cu, Pb, Zn and Cd to the cell surface of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Toxicological and Environmental Chemistry* 72: 93-104.

UNICHIM 2396: 2014. Qualità dell'acqua – Determinazione della tossicità letale a 24h, 48h e 96h di esposizione con naupli di *Tigriopus fulvus* (Fischer, 1860) (Crustacea: Copepoda).

Wei Y, Zhu N, Lavoie M, Wang J, Qian H, Fu Z 2014. Copper toxicity to *Phaeodactylum tricornutum*: a survey of the sensitivity of various toxicity endpoints at the physiological, biochemical, molecular and structural levels. *Biomaterials* 27(3): 527-537.

Wernersson A S, Carere M, Maggi C, Tusil P, Polesello S, Lacchetti I et al. 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 27(7): 1-11.

DOI: 10.1186/s12302-015-0039-4

# ANTIOXIDANT RESPONSES OF *CHAMELEA GALLINA* TO ENVIRONMENTAL CHANGES IN PORTO LEVANTE (ROVIGO, ITALY)

by G. Moltedo, B. Catalano, G. Martuccio, A. Mercatini, C. Sebbio, D. Berto, G. Franceschini, C. Virno Lambertini

a Istituto Superiore per la Ricerca e Protezione Ambientale (ISPRA)  
- ginevra.moltedo@isprambiente.it

---

**Abstract** - The venus clam *Chamelea gallina* (Linnaeus 1758) is an infaunal bivalve species which plays an important ecological and economic role in Adriatic sea. One of the harvesting site in Northern Adriatic Sea for this species is located offshore the outlet of Maistra's Po River, one of the major channels of PO Delta. During the last decade the coastline morphology of this area has been subjected to several changes. In particular an artificial gap was opened in 2008 in the sandbank in front of the Maistra's Po outlet and a gradual enlargement did developed since then deeply modifying local circulation and river inputs to maritime area.

The aim of this study was to assess the effect of this morphological change on seawater characteristics and to assess the biological effects on clams occurred between 2012 and 2014.

During the three years of this study changes in seawater salinity, temperature, dissolved oxygen, total suspended particulate matter and nutrients were observed together with a variation in clam antioxidant responses.

These results suggested that coastline morphological changes occurred between 2012 and 2014 have modified water characteristic of the area and caused variation in antioxidant efficiency in clams. Moreover they confirm that *C. gallina* has an active antioxidant system highly involved in the defense mechanisms toward environmental variations. This information may be suitable for use this species as bioindicator in environmental monitoring projects.

Keywords: Oxidative stress, Marine organisms, *Chamelea gallina*, Biomarker, Northern Adriatic

## ***Introduction***

Porto Levante is located in the protected area of Delta of Po (Rovigo, Italy) in North Adriatic Sea. The northern Adriatic Sea basin is widely influenced by the Po River input (Po is approximately 50% of the total riverine input in this area) which affects the water mass characteristics and hydrodynamics through the introduction of low salinity water, organic matter and nutrients (Giani et al., 2009; Russo et al., 2005). The Po River's estuary constitutes a dynamic system subjects to several human activities and natural events and its shape is the consequence of the complex morphological events that continuously happen in the area. Today

the Po Delta consists of 5 principal outlets including the Maistra's Po River and 14 secondary tributaries. In 2008 following a coastline management decision, a gap was artificially opened up in the coastline of Porto Levante, northern side of Maistra's Po outlet. After this event the morphology of the coastline between Boccasette Beach and Scanno Cavallari deeply changed. In particular in 2013 an ISPRA's survey revealed a 200 m gap enlargement in the coastline respect to 2012 (ISPRA, 2015).

The area in front of the Maistra's Po outlet is an important clam fishery site. The venus clam *C. gallina* was chosen as target organism in this study based on its important ecological and commercial roles in the Adriatic Sea. The health status of this species is influenced by biotic and abiotic factors (Moschino et al., 2006). In particular biotic factors such as reproductive cycle and metabolic activity together with abiotic factors such as salinity, temperature, oxygen bioavailability could affect oxidative status of bivalve molluscs (Abele et al., 2012; Bocchetti and Regoli, 2006). Under basal condition Reactive Oxygen Species (ROS) are naturally produced during several cellular pathways of aerobic metabolism and the adverse effects of oxyradicals are prevented by the antioxidant system consisting of a wide array of low molecular weight scavengers and antioxidant enzymes which interact in a sophisticated network with both direct and indirect effects (Regoli, Giuliani, 2014).

In order to evaluate the environmental changes related to the coastline morphological changes seawater characteristics of the area such as salinity (SAL), temperature (T), dissolved oxygen (OD), total suspended particulate matter (TSM), particulate organic carbon (POC), total particulate nitrogen (TPN) and Chlorophyll-a (Chl-a) were measured from 2012 to 2014, before and after the 200 m gap enlargement respectively.

Moreover, in the same period, in order to assess the effects on the health status the following biological responses related to antioxidant system were analyzed in the bioindicator species *C. gallina*: 1) catalase activity (CAT), enzyme involved in detoxification of hydrogen peroxide to molecular oxygen and water; 2) total oxyradical scavenging capacity (TOSC) toward peroxy and hydroxyl radicals, measuring the capability of the antioxidant system to transform radicals to non-reactive molecules; 3) lipid peroxidation products (malondialdehyde-MDA), indicating cellular damage due to oxidative stress.

### ***Materials and methods***

The study area is situated about 2 km offshore Porto Levante (Rovigo, Italy) coastline (southern side of Levante's Po River and northern side of Maistra's Po River), in front of Vallona Lagoon (Fig.1). Depth ranges from 5 to 12 m. Sampling was carried out in the summer season of three consecutive years: 2012, 2013 and 2014.

Hydrological profiles were acquired using the multiparametric water probes SBE9 (Sea-Bird Electronics) equipped with optional sensors. T and OD were directly measured, while SAL was calculated from measured electrical conductivity. To compare different years the mean surface value (0-1.5 m) for each parameter was calculated.

Surface water samples were collected by Niskin bottles (5 L). To analyse TSM and Chl-a samples were filtered on GF/F filters precombusted (450 °C for 4 h) and stored at -20 °C before analyzing. Quantification of TSM was performed according Strickland and Parsons (1972) whereas Chl-a was measured according to Parsons et al. (1984). To analyse POC and TPN samples were filtered (0.1-0.2 L) on GF/F filters and stored at -20 °C before analyzing. POC and TPN were determined by a CHN Elemental Analyzer Flash 2000 (Thermo Scientific) after removal of carbonates by HCl treatment (Hedges and Stern, 1984).

Specimens of *C. gallina* (mean length: 24±1 mm) were sampled in the study area using hydraulic dredges (cage: 2.80 m width). Organisms, immediately after collection, were transferred in laboratory and digestive glands were dissected (21 pools, about 20 organisms each), fixed in liquid nitrogen and maintained at -80°C until the biochemical analysis.

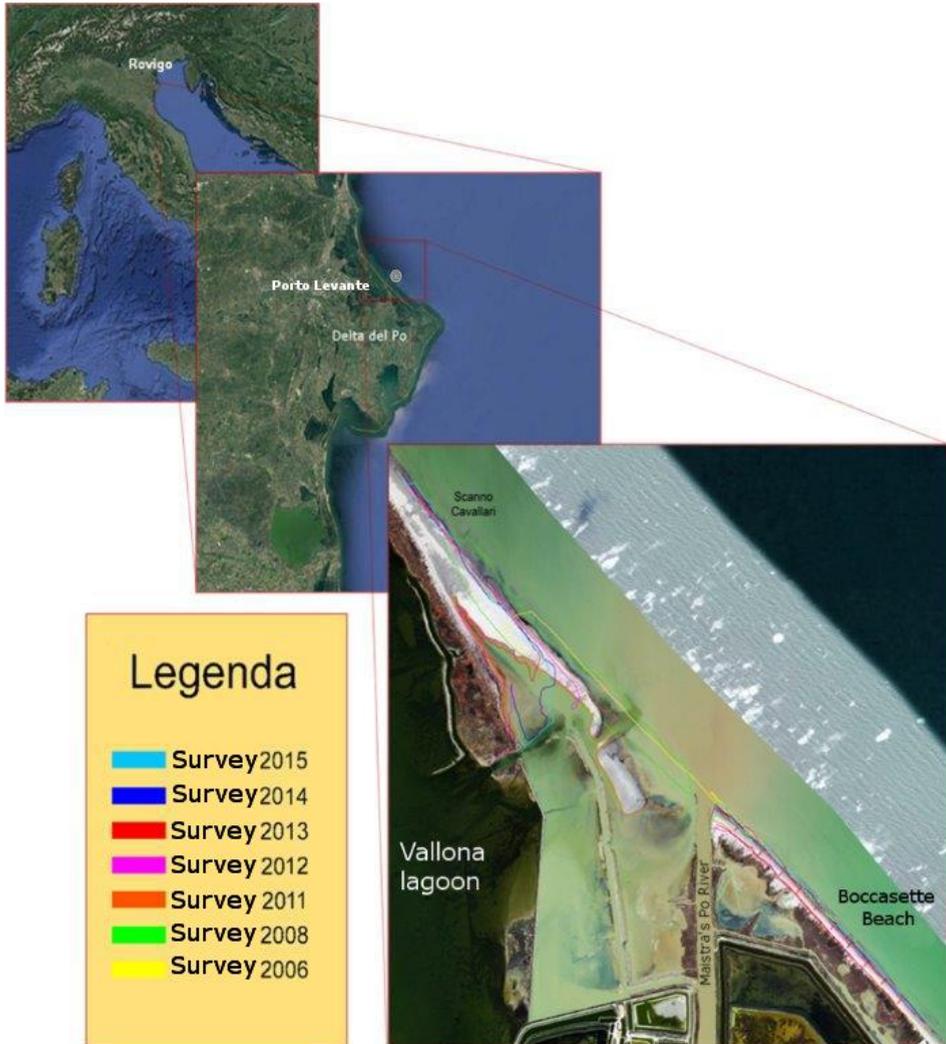
For catalase activity and for TOSC Assay samples were homogenized (1:5 ratio w/v) in 100 mM K-phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 0.1 mg/ml bacitracin, 0.008 TIU/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 0.5 µg/ml pepstatin, NaCl 2.5%, and centrifuged at 100000g for 70min at 4°C. The supernatant was stored at -80°C until the analysis.

Protein quantification was performed according to Lowry et al. (1951) on cellular extracts.

The enzymatic activity of catalase (CAT) was measured spectrophotometrically according to Aebi (1984), and to Regoli and Principato (1995).

The total oxyradical scavenging capacity toward peroxy (TOSC ROO·) and hydroxyl radicals (TOSC OH·) was measured through the TOSC Assay, a gas chromatographic method (Regoli and Winston, 1999).

The content of MDA was measured in samples prepared and analysed according to Shaw et al. (2004) and to Bocchetti and Regoli (2006).



*Figure 1 – Morphological changes of the coastline in the north of Po di Maistra. Area situated between Boccasette beach and Scanno Cavallari (Porto Levante, Ro). (Font: ISPRA Technical Report 2015).*

In order to evaluate the difference in biological response before (2012) and after (2013-2014) the 200 m gap enlargement in the coastline of Porto Levante a non parametric statistical analysis was performed: ANOVA of Kruskal Wallis. When differences were statistically significant a post-hoc analysis was performed, using a Mann Whitney U-test. A significance level of 5% was adopted ( $p < 0.05$ ). All data was processed using the software package STATISTICA® v.8.

## Results

Physical-chemical and biological results are summarized in Table 1 and Figure 1 respectively.

Temperature and salinity of surface water showed a gradual decrease, while dissolved oxygen showed gradual increase from 2012 to 2014. Total suspended particulate matter, particulate organic carbon, total particulate nitrogen and chlorophyll-a increased from 2012 to 2013.

Most of biological responses related to oxidative stress measured in clams (catalase activity, total oxyradical scavenging capacity toward hydroxyl radicals, level of malondialdehyde) significantly increased from 2012 to 2014. Only the total oxyradical scavenging capacity toward peroxy radicals didn't show a significant change from 2012 to 2013 but did significantly increased from 2012 to 2014.

*Table 1 - Physical-chemical parameters of surface seawater collected in summer season of three years (2012, 2013, 2014). T: temperature; Sal: salinity; OD: dissolved oxygen; TSM: total suspended particulate matter; POC: particulate organic carbon; TPN: total particulate nitrogen; Chl-a: chlorophyll-a. LOQ: 0.2 e 0.5  $\mu$ M for POC e TPN; 0.15 mg/L for TSS, 0.1  $\mu$ g/L for la chlorophyll-a.*

Parameter	u.m.	Years		
		2012	2013	2014
T	°C	26,5	25,4	20,3
Sal	psu	34,0	31,5	26,8
OD	mg/L	6,7	8,6	10,3
TSM	mg/L	1,65	5,09	3,16
POC	$\mu$ M	30,4	128,6	60,4
TPN	$\mu$ M	1,4	16,8	7,1
Chl-a	$\mu$ g/L	1,3	5,8	2,2

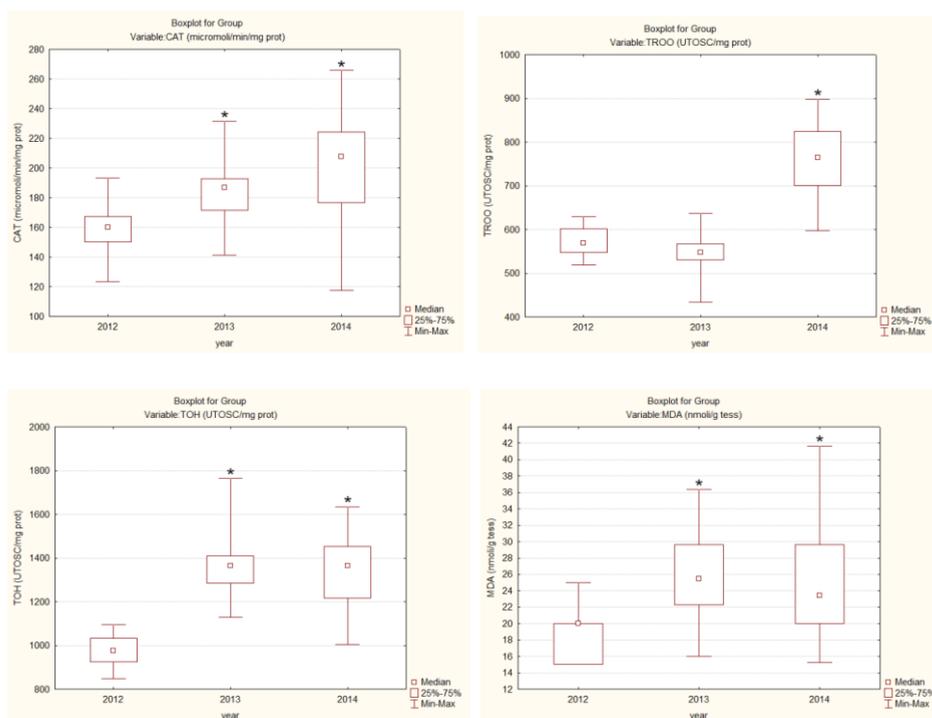


Figure 1 – Median, 25-75 percentile, minimum and maximum] of enzymatic activity of catalase (CAT), total oxyradical scavenging capacity toward peroxy (TROO.) and hydroxyl radicals (TOH.), level of malondialdehyde (MDA) (years 2012, 2013, 2014). \*Significant differences respect to 2012 ( $p < 0,05$ ).  $N=21$ .

## Discussion/Conclusions

In the surface seawater of the area in front of the Maistra's Po outlet a decrease in salinity and temperature, together with an increase in dissolved oxygen was observed in 2013 and in 2014 respect to 2012, probably related to the major riverine input.

Then the increase of TSM and nutrients in the particulate phase (POC, TPN) during the 2013 with respect to 2012 and 2014, linked to the higher chlorophyll-a values, could suggest a phytoplankton bloom favoured by the partial ingression of fluvial waters.

It is well known that oxygen, temperature and salinity may influence oxidative processes in marine organisms (Parihard et al., 1997; Abele et al., 2012) and that oxidative changes are typical responses in bivalve molluscs during the periods of more intense feeding activities, as a consequence of both higher oxidative metabolism and/or assumption of antioxidants by the diet (Regoli et al., 2002; Bocchetti et al., 2006).

Therefore the changed characteristics of environment rich of particulate nutrients, phytoplankton and oxygen could have determined an increase

of metabolism and oxygen intracellular fluxes, with a consequent increasing of ROS production in bivalves.

ROS are extremely potent prooxidants capable of reacting with critical cellular macromolecules, possibly leading to enzyme inactivation, lipid peroxidation, DNA damage and ultimately to cell death (Winston and Di Giulio, 1991). Therefore to inhibit oxyradicals formation most of organisms have developed some defense strategies including enzymes and non-enzymatic compounds.

In the organisms of this study the increase of lipid peroxidation's products (malondialdehyde) and the increase of ROS neutralizing capability suggest alterations at membrane level and activation of defense strategies typical of oxidative stress condition. In particular the defence strategy of studied clams against ROS was characterized both by individual antioxidant enzyme (catalase) and by total oxyradical scavenging capacity.

Our findings suggested that morphological changes of coastline off Porto Levante observed between 2012 and 2014 have modified physico-chemical characteristics of seawater with a consequent variation in antioxidant efficiency in clams of the study area. They are in agreement with previous studies on *C. gallina* about high vulnerability in terms of oxidative stress to changes of environmental condition such as temperature, salinity and oxygen availability (Matozzo, 2012, 2013; Monari et al., 2007; Moschino and Marin, 2006).

Further studies in this area could be carried out to assess eventual temporal and spatial trend of these biological effects at different distances from coastline and eventual other biological effects involved in the defence strategy of *C. gallina* to environmental changes.

The biological responses examined in this study may be suitable for environmental monitoring studies using this species as bioindicator.

### ***Aknowledgement***

This work is part of an environmental monitoring plan funded by Adriatic LNG.

### ***References***

- Abele D, Vasquez-Medina JP, Zenteno-Savin T. 2012. Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, 367-380. Blackwell Publishing Ltd.
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Bocchetti R and Regoli F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65: 913-921.
- Giani M, Berto D, Rampazzo F, Savelli F, Alvisi F, Giordano P, Ravaioli M, Frascari F. 2009. Origin of sedimentary organic matter in the northern-western Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84: 573-583.

- Hedges JI, Stern JH. 1984. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography* 29: 657-663.
- ISPRA. 2015. Piano di monitoraggio ambientale (fase esercizio) del Terminale GNL di Porto Viro e della condotta di collegamento alla terraferma. Relazione tecnico scientifica (28E). Rilievo topografico della linea di costa. Pp. 21.
- Lowry OH and Rosenbrougl RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 266-275.
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Finos L, Bressan M, Marin MG. 2012. First Evidence of Immunomodulation in Bivalves under Seawater Acidification and Increased Temperature. *PLoS ONE* 7(3): e33820.
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Bressan M, Marin MG. 2013. Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*?. *Marine Pollution Bulletin* 72: 34-40.
- Monari M, Matozzo V, Foschi J, Cattani O, Serrazanetti GP, Marin MG. 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology* 22: 98-114
- Moschino V, Marin M G. 2006. Seasonal changes in physiological responses and evaluation of "well-being" in the Venus clam *Chamelea gallina* from the Northern Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* 145. 433-440
- Parsons TR, Maita Y, Lalli CM. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford, 173pp.
- Regoli F and GW Winston. 1999. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidant for peroxyxynitrite, peroxy radicals and hydroxyl radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156: 96-105.
- Regoli F, Nigro M, Chiantore M, Winston GW. 2002. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Sci. Total Environ.* 289: 205-211.
- Regoli F, ME Giuliani. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research* 93: 106-117.
- Russo A, Maccaferri S, Djakovac T, Precali R, Degobbi D, Deserti M, Paschini E, Lyons DM. 2005. Meteorological and oceanographic conditions in the northern Adriatic Sea during the period June 1999-July 2002: Influence on the mucilage phenomenon. *Science of the Total Environment* 353: 24-38.
- Strickland JDH, Parsons TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 167: 311.
- Totti C, Cucchiari EM, Romagnoli T. 2002. Intra and interannual variability of phytoplankton in coastal area of Senigallia (Northern Adriatic Sea) from 1988 to 2000. *Biol. Mar. Medit.* 9: 391-399.
- Parihar MS, Javeri T, Hemnani T, Dubey AK, Prakash P. 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and

glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. J. Thermal Biol. 22: 151-156.

Winston GW, Di Giulio RT. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology 19: 137-161.

# CHARACTERIZATION OF CHOLINESTERASES IN THE POLYCHAETE *DIOPATRA NEAPOLITANA*.

by E. Mennillo<sup>a</sup>, V. Casu<sup>bc</sup>, F. Tardell<sup>bc</sup>, L. De Marchi<sup>p</sup>, R. Freitas<sup>b</sup>, C. Pretti<sup>bc</sup>

<sup>a</sup>Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, San Piero a Grado (PI) 56122, Italy – elvira.mennillo@gmail.com

<sup>b</sup>Departamento de Biologia & CESAM, University of Aveiro 3810-193, Portugal – rosafreitas@ua.pt

<sup>c</sup>Interuniversity Center of Marine Biology (CIBM) “G. Bacci”, Leghorn 57128, Italy – carlo.pretti@unipi.it

---

**Abstract** - Cholinesterases of *Diopatra neapolitana* were characterized for their activity in whole body and different body segments (apical, intermediate, posterior), substrate affinity (acetyl-, butyryl-, propionylthiocholine), kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) and *in vitro* response to model inhibitors (eserine hemisulfate, iso-OMPA, BW284C51) and carbamates (carbofuran, methomyl, aldicarb and carbaryl). Results showed that the rate of hydrolysis for acetyl- and propionylthiocholine was higher in the posterior segment than the apical/intermediate segments and whole body. Cholinesterases of *D. neapolitana* showed a substrate preference for acetylthiocholine followed by propionylthiocholine; butyrylthiocholine was poorly hydrolyzed indicating, together with the absence of inhibition by the specific inhibitor and the absence of reactive bands in native electrophoresis, a lack of an active butyrylcholinesterase, differently than that observed in other Annelida. The degree of inhibition by selected carbamates of cholinesterase activity with propionylthiocholine as substrate resulted higher than that observed with ATCh-ChE activity; aldicarb showed the highest inhibitory effect.

Keywords: Cholinesterase, *Diopatra neapolitana*, Marine, Sediment, Pesticide

## **Introduction**

Biochemical markers have been widely used in environmental monitoring studies to assess the impacts of single/mixture of pollutants (Freitas et al., 2012). Considering anthropogenic contaminants, pesticides are among the most widespread in soil (Arias-Estévez et al., 2008), and can reach surrounding aquatic ecosystems through water drainage pathways and runoff. Organophosphates (OPs) and carbamates (CBs) are largely employed as active substances in commercial pesticides; although these pesticides differ chemically, they act similarly by exerting a biocide effect on target organisms by inhibiting the breakdown of acetylcholine with effects ranging from disorders in neurotransmission and muscular discoordination to death (Kousba et al., 2003). In non-target organisms, the inhibition of cholinesterases (ChE) activity has been considered to be a

sensitive biomarker to assess ChE-inhibiting contaminants in invertebrates and vertebrates both from soil and water ecosystems (Sanchez-Hernandez and Sanchez-Moreno, 2002). Species of the genus *Diopatra* can reach high densities in many habitats food source and refuge for a large variety species. Therefore, the aim of the present study was to characterize the ChE of *D. neapolitana* and investigate the relevance of ChE activity as early warning of contamination impacts in this species. Enzyme activity was characterized *in vitro* for investigating the presence of the main involved ChE forms by using different substrates and model inhibitors together with four selected CBs. In order to locate the distribution of ChEs in the body of *D. neapolitana*, enzyme activities were also investigated in different body segments. Additionally, a native gel electrophoresis study was discussed.

### ***Materials and methods***

Animals: specimens of *D. neapolitana* were collected from the Mira channel (Aveiro, Portugal) and acclimated to aquarium conditions. The cholinesterases were characterized in S9 fractions of whole body and different body segments (apical, intermediate and posterior).

Characterization of ChEs: the enzymatic activity with the substrates ATChI, BTChI and PTChI was measured for each tested concentration. For inhibition studies, samples were incubated for 30 min with: eserine hemisulfate (aspecific inhibitor of ChE), BW284C51 (selective inhibitor for AChE) and iso-OMPA (selective inhibitor for BChE). Kinetic parameters of the enzyme were determined.

Inhibition of ChEs by carbamates: ATChI-ChE and PTChI-ChE inhibition was assayed using four carbamates (carbofuran, methomyl, aldicarb and carbaryl) for 30 min. IC<sub>50</sub> values were estimated for each inhibitor.

Native electrophoresis: native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed (Kristoff et al., 2006). Bands with ChE activity and with other carboxylesterase (CE) activity were visualized with two different solution according to Li et al. (2005). For the inhibition test gels were pre-incubated with eserine hemisulfate for 30 min. Molecular weights (MW) of the bands were estimated.

Statistical analysis: One way-ANOVA, followed by Dunnet's or Tukey's test, was performed to assess differences between treatments or conditions. Kinetic parameters (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>) and IC<sub>50</sub> values were calculated by fitting experimental data with a nonlinear regression analysis (log inhibitor vs. response). All the above mentioned analyses were calculated with GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA.

### ***Results***

The enzymatic activity of ChE was performed on different body segments and whole soft tissue of *D. neapolitana* (Fig. 1). The enzyme activity of ATChI-ChE was higher in posterior segments, followed by intermediate segments while the lowest values were observed for the whole organism and apical region samples. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between posterior and apical regions as well as between posterior region and the whole body, but no significant differences were found between posterior and intermediate region. The enzyme activity of PTChI-ChE in the

posterior segment was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than at the apical segments and no significant differences were found neither in relation to the intermediate region nor to whole body. BTChI-ChE activity was low in all segments and whole body. In the subsequent experiments, the posterior segment, showing the highest rate of hydrolysis, was used for the characterization of kinetic parameters. Since the intermediate segment was not significantly different from posterior segment, it was used for the cholinesterase-inhibitors experiments.

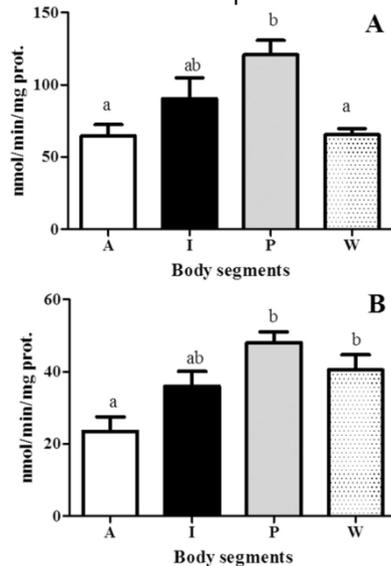


Fig 1. ChE activity (mean±SE) expressed as nmol/min/mg prot. (A: ATChI-ChE, 470  $\mu$ M, B: PTChI-ChE, 1880  $\mu$ M) on different body segments (A: apical; I: intermediate; P: posterior; W: whole body). Different letters indicate significant differences  $p < 0.05$ , one-way ANOVA (Tukey's test).

Figure 2 shows the non-linear regression determining the kinetic curves of cholinesterase activity performed on *D. neapolitana* (posterior segment) with different substrates. ATChI-ChE and PTChI-ChE curves fit with an  $R^2 = 0.90$  and  $0.92$ , respectively, while BTChI-ChE curve fit with an  $R^2 = 0.78$ . The highest enzymatic activity, expressed in nmol/min/mg protein was  $117.7 \pm 1.7$  (ATChI),  $64.1 \pm 3.3$  (PTChI) and  $2.6 \pm 0.08$  (BTChI). The study of cholinesterase inhibition with model inhibitors (Fig 3 A and B) showed that only eserine hemisulfate inhibited cholinesterase activity over 70% (in comparison to control) starting from the concentration of 1  $\mu$ M, with a similar non-linear regression curve for both ATChI-ChE and PTChI-ChE. The inhibitory effect of BW284C51 on ATChI-ChE was significantly different ( $p < 0.001$ ) from the control at the highest tested concentrations (800, 400 and 200  $\mu$ M) showing about 40% activity inhibition. The inhibitor iso-OMPA did not show any rate of inhibition with all tested substrates.

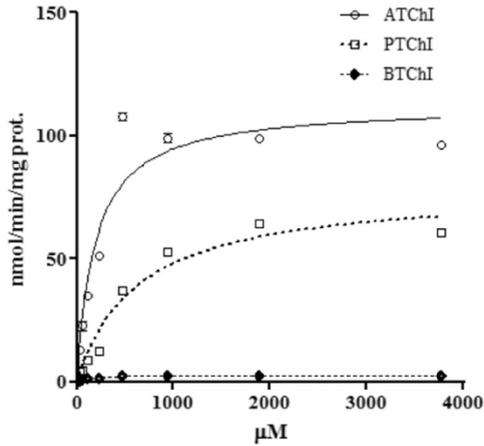


Fig 2. Non-linear regression of ChE activity performed on *D. neapolitana* (posterior segment) with ATChI, PTChI and BTChI (range 29–3770  $\mu\text{M}$ ) as substrate.

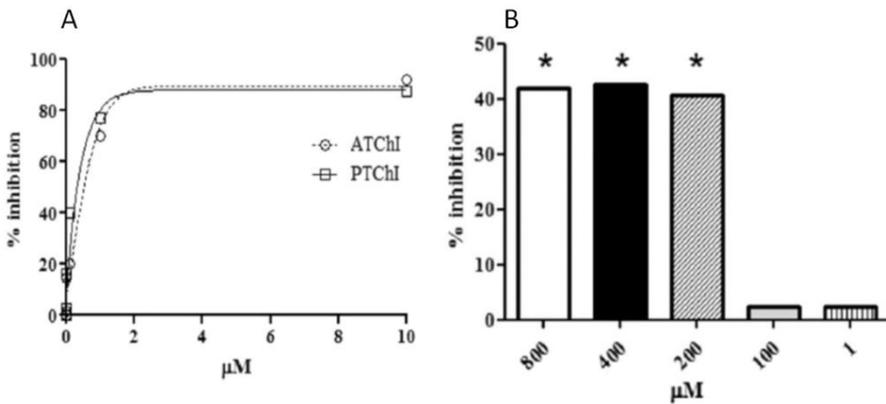


Fig 3. **(A)** Effect of eserine on ChE activity (ATChI 470  $\mu\text{M}$  and PTChI 1880  $\mu\text{M}$ ) performed on *D. neapolitana* (intermediate segment,  $n=5$ ). **(B)** Effect of BW284C51 on ATChI 470  $\mu\text{M}$  (intermediate segment,  $n=5$ ). Data are expressed as % of inhibition of cholinesterase activity performed on *D. neapolitana* \* $p<0.001$  significantly different from control (one-way ANOVA, Dunnett's test).

Proteins from S9 of *D. neapolitana* were separated on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis together with purified AChE from electric eel and BChE from equine serum (Fig. 4).

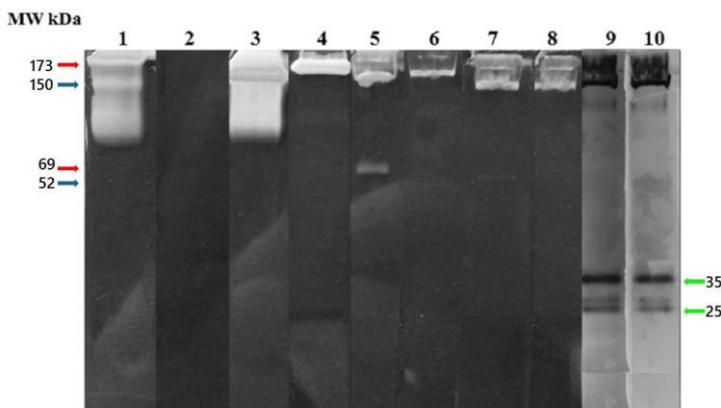


Fig.4 Native polyacrylamide gel electrophoresis of extract from *D. neapolitana*. Red arrows stands for MW of AChE; blue arrows stands for MW of PChE and green arrows stands for CE. Lane 1: hydrolysis of BTChI by equine serum BChE. Lane 2: absence of BTChI-hydrolysis in S9 of *D. neapolitana* Lane 3: hydrolysis of ATChI by electric eel AChE. Lane 4: the same batch incubated with the inhibitor eserine. Lane 5: ATChI-ChE reactive bands in S9 of *D. neapolitana*. Lane 6: the same batch incubated with the inhibitor eserine. Lane 7: PTChI-ChE reactive bands in S9 of *D. neapolitana*. Lane 8: the same batch incubated with the inhibitor eserine. Lane 9: CE reactive bands in S9 of *D. neapolitana*. Lane 10: the same batch incubated with the inhibitor eserine.

Tables shows the in vitro inhibition ( $IC_{50}$  expressed as  $\mu M$ ) of ATChI-ChE (table 1) and PTChI-ChE (table 2) activities by the selected carbamates.  $IC_{50}$  values indicated that the activity of both enzymes was inhibited by all tested carbamates (except Carbaryl) as much as the model inhibitor eserine and PTChI-ChE activity showed higher inhibition than ATChI-ChE activity.

Table 1. Inhibitory effect on ATChI-ChE activities of four selected carbamates expressed as  $IC_{50}$  value ( $\mu M$ ); 95% confidence limits (C.L. 95%) and goodness of fit ( $R^2$ ) are also reported.

ATChI-ChE	$IC_{50}$	$IC_{50}$ C.L. 95%	$R^2$
Carbofuran	0.56	0.42-0.73	0.99
Methomyl	0.31	0.27-0.35	0.99
Aldicarb	0.22	0.15-0.32	0.98
Carbaryl	4.93	3.05-7.99	0.97

Table 2. Inhibitory effect on PTChI-ChE activities of four selected carbamates expressed as IC<sub>50</sub> value (μM); 95% confidence limits (C.L. 95%) and goodness of fit (R<sup>2</sup>) are also reported.

PTChI-ChE	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> C.L. 95%	R <sup>2</sup>
Carbofuran	0.27	0.19-0.36	0.98
Methomyl	0.23	0.18-0.31	0.99
Aldicarb	0.11	0.08-0.13	0.99
Carbaryl	3.12	2.02-4.77	0.97

## Discussion

ChEs activities in different body segments were compared with those of whole body. Results showed that the highest rate of hydrolysis for both substrates ATChI and PTChI was detected in the posterior segment, and significant differences were found between apical, posterior and whole body segments when ATChI was used as the substrate. In the present study a preference of ChE of *D. neapolitana* for ATChI was observed, followed by PTChI, while BTChI was poorly hydrolysed. Different levels of ChE-substrate affinity can be commonly observed in invertebrates (Valbonesi et al., 2003). Differently from other Annelida and other marine invertebrates, the substrate BTChI was poorly hydrolyzed, probably due to a lack of an active BChE. The absence of reactive bands in the native electrophoresis gel analysis with S9 of *D. neapolitana* supported this hypothesis. The focus of the present work was to fulfill the lack of info about basal levels and kinetic parameters of ChEs in *D. neapolitana*, together with the characterization by the use of model inhibitors. The non-selective ChE inhibitor eserine, the specific-AChE inhibitor BW284C51 and the specific-BChE inhibitor iso-OMPA were used to characterize their inhibition on *D. neapolitana* ChE activity. ATChI-ChE and PTChI-ChE activities were both significantly inhibited by serine hemilsulfate in a dose-dependent manner. These results were consistent with those obtained in *Capitella teleta* (Gomes et al., 2014) and *Eisenia andrei* (Caselli et al., 2006). The inhibition by eserine at 1 μM-of both ATChI-ChE and PTChI-ChE was also detected by electrophoresis analysis. Since the S9 used was poorly purified, a number of non-specific esterases able to metabolize both substrates might be present. However, the high sensitivity to eserine could suggest that non-specific esterases are less represented than ChEs in tissues from *D. neapolitana*. ATChI-ChE activity was inhibited by BW284C51 only at the highest tested concentrations and iso-OMPA did not show any rate of inhibition. High ATChI-ChE and PTChI-ChE activities are both strongly inhibited in vitro by all tested carbamates where aldicarb > methomyl > carbofuran > carbaryl in terms of inhibitory effect. All tested carbamates had an inhibitory effect stronger on PTChI-ChE than on ATChI-ChE. .

## Conclusion

Our results indicate that the polychaete *D. neapolitana* could be used as sentinel organism for monitoring anti-cholinesterase contaminants in soft bottom estuarine sediments. Levels of enzyme activities are different along the body length with higher ATChI-ChE activities in the posterior segment than others. ATChI-ChE and PTChI-ChE activities are both strongly inhibited by all tested carbamates. The IC<sub>50</sub> values are environmentally relevant. Although further investigation on the sensitivity of *D. neapolitana* ChE to contaminants is needed, valuable indications for the usefulness of ChE activity in a sentinel species to biomonitor the pesticide contamination is given.

## References

- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto JC, García-Río L 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123:247–260.
- Caselli F, Gastaldi L, Gambi N, Fabbri E 2006. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143:416–421.
- Freitas R, Costa E, Velez C, Santos J, Lima A, Oliveira C, Maria Rodrigues A, Quintino V, Figueira E 2012. Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination: comparison between the bivalve *Cerastoderma edule* and the Polychaete *Diopatra neapolitana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75:109–118.
- Gomes IDL, Lemos MFL, Soares AMVM, Barata C, Faria M 2014. The use of cholinesterase as potential biomarker: in vitro characterization in the polychaete *Capitella teleta*. *Mar. Pollut. Bull.* 85:179–185.
- Kousba AA, Poet TS, Timchalk C 2003. Characterization of the in vitro kinetic interaction of chlorpyrifos-oxon with rat salivary cholinesterase: a potential biomonitoring matrix. *Toxicology* 188:219–232.
- Kristoff G, Guerrero NV, de D'Angelo AMP, Cochón AC 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicology* 222:185–194.
- Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, Lockridge O 2005. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* 70 (11): 1673–1684.
- Sanchez-Hernandez JC, Sanchez-Moreno B 2002. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: enzymological characterization. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (11):2319–2325.
- Valbonesi P, Sartor G, Fabbri E 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Sci. Total Environ.* 312:79–88.

# ECOTOXICITY OF KETOPROFEN AND THE S(+)-ENANTIOMER (DEXKETOPROFEN): BIOASSAYS IN FRESHWATER MODEL SPECIES AND RESPONSES OF FISH PLHC-1 CELL-LINE

by E. Mennillo<sup>a</sup>, A. Arukwe<sup>b</sup>, G. Monni<sup>a</sup>, V. Meucci<sup>a</sup>, L. Intorre<sup>a</sup>, C. Pretti<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, San Piero a Grado (PI) 56122, Italy – elvira.mennillo@gmail.com

<sup>b</sup>Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim, Norway - augustine.arukwe@ntnu.no

<sup>c</sup>Interuniversity Center of Marine Biology (CIBM) "G. Bacci", Leghorn 57128, Italy – carlo.pretti@unipi.it

---

**Abstract** -. The ecotoxicological properties of ketoprofen or its enantiomer (dexketoprofen) in different experimental models were evaluated. Firstly, by acute and chronic toxicity tests using three representative model organisms (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Ceriodaphnia dubia*). Secondly, by evaluating the responses of biotransformation systems and multidrug resistance associated proteins (MRP1/MRP2) using the PLHC-1 fish hepatic cell-line. Data from both acute and chronic exposure of model organisms showed that dexketoprofen produced an higher toxicity (inhibition of bioluminescence and algal growth and crustacean mortality/immobilization), compared to ketoprofen; however effects were detectable only at high concentrations. The test with *P. subcapitata* showed that ketoprofen and dexketoprofen exhibited different values for the no observable effect concentration (NOEC) and lowest observable effect concentration (LOEC). Further, ketoprofen and dexketoprofen in PLHC-1 cells showing compound-, time- and dose-dependent differential effects on phase I and II biotransformation systems. For CYP1A, cell exposure to ketoprofen and dexketoprofen differed at transcript and activity levels. Exposure to these pharmaceuticals modulated MRP1 and MRP2 mRNA levels and these effects were also compound-, time- and dose-dependent. Overall, the present study revealed the interactions between these compounds and key detoxification systems, and different sensitivity to the racemic mixture compared to its S(+) enantiomer.

Keywords: NSAIDs, Bioassays, PLHC-1 cells, Enantiomer, Ecotoxicity

## *Introduction*

The presence of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and surface waters is an emerging environmental issue that constitute potential risk for aquatic ecosystems and human health (Fent et al., 2006). There is a huge amount of data on the beneficial and side effects

of pharmaceuticals, but there is limited information about the impact of these compounds to non-target organisms in the environment. Depending on the physical and chemical properties of either the compounds or the host compartments, these pharmaceuticals could be biotransformed and the resulting metabolites could have different fates in the environment (Khetan and Collins, 2007). Ketoprofen is one of the most widely used NSAIDs (Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs). It has been detected at low concentrations in environment (0.41 - 5.7 µg/L). Ketoprofen is a racemic mixture characterized from two enantiomers (Fent et al., 2006). The aim of this study was to evaluate the ecotoxicity of racemic mixture (ketoprofen) or its dextrorotatory enantiomer (dexketoprofen) in freshwater model organisms using two different approaches. Firstly, by acute and chronic toxicity tests using three representative model organisms (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Ceriodaphnia dubia*). Secondly, by evaluating the responses of biotransformation systems and multidrug resistance associated proteins (MRP1/MRP2) using the *in vitro* fish cell model (*Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma, PLHC-1).

### ***Materials and methods***

Chemical: Ketoprofen and its enantiomer dexketoprofen S(+)-ketoprofen were purchased from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Stock standard solutions of pharmaceuticals were prepared in deionized water at 10 mg/L and stored at 4°C in amber glassware.

Ecotoxicological Bioassays: *Vibrio fischeri*, the inhibition of bioluminescence test was performed according to the ISO procedures (ISO 11348-3: 2007). For identification of EC<sub>50</sub> a full test was performed with dilution series (from 3.90 µg/L to 2000 µg/L, 10 dilutions for each tested pharmaceuticals).

*Pseudochirkeriella subcapitata*, the inhibition of growth was evaluated according to the protocol described in ISO procedures (ISO 8692: 2012) with slight modifications. For the determination of EC<sub>50</sub>, LOEC and NOEC a full test was performed by different dilutions of pharmaceuticals. Experiments were performed in triplicate.

*Ceriodaphnia dubia*, chronic toxicity assay was performed in according to US EPA 2002b. Third brood neonates (<24 h old) were exposed for 7 days at different concentrations of ketoprofen and dexketoprofen ranging from 1 to 1000 µg/L. At the end of the assay was evaluated the immobilization/mortality and the reproduction rate.

PLHC-1 cell line: cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATTC CRL 2406), is derived from the hepatocellular carcinoma of the Topminnow *P. lucida*. Biotransformation responses were evaluated in cells exposed for 48 and 72 hours to various concentration of pharmaceuticals:

- Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was performed according to Burke and Mayer (1974) as markers for phase I biotransformation activity.

- Glutathione-S-transferase (GST) activity was measured following the spectrophotometric assay described by Habig et al. (1974) as markers for phase II of biotransformation.

- Quantitative real-time PCR analysis was performed with gene-specific primers: CYP1A (cytochrome P450 1A, MRP1 and MRP2 [multidrug resistance associated proteins]). Statistical analysis. Significant differences between control and exposure groups were performed using ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test). The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Analyses were performed using GraphPad Prism, version 6.01 (GraphPad Software Inc. 2012). EC values and their correspondent confidence limits (95%) were calculated by the linear interpolation methods.

## Results

*V. fischeri*. No effect was observed for ketoprofen. Differently, dexketoprofen concentration of 500  $\mu\text{g/L}$  and above, produced an inhibition of bioluminescence expressed as 1 % of RBU value at 15 min incubation time. Consequently, it was possible to obtain an  $\text{EC}_{50}$  value of 1046  $\mu\text{g/L}$  (C.L 95%=372-2935).

*P. subcapitata*. The growth inhibition test showed that ketoprofen and dexketoprofen exhibited different values for the no observable effect concentration (NOEC) and lowest observable effect concentration (LOEC). Data were presented in figure 1. Dexketoprofen exhibited an  $\text{EC}_{50}$  value of 3.7-fold lower than ketoprofen (table 1).

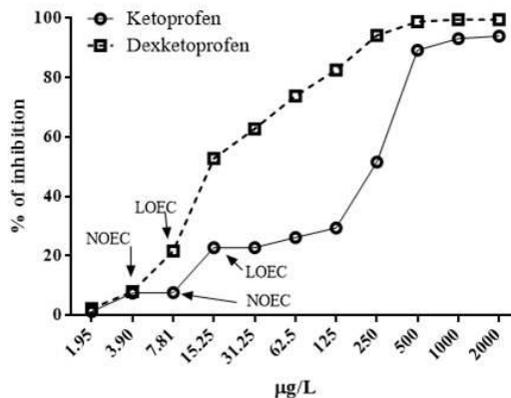


Fig 1. Inhibition of growth in *P. subcapitata* (96 h incubation) exposed to serial dilution of ketoprofen and dexketoprofen. Values are expressed as % of inhibition respect to control set at 100 %.

Table 1. Inhibitory effect on algal growth expressed as EC<sub>50</sub> value (µg/L) and 95% confidence limits (C.L. 95%) are reported.

NSAIDs	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> C.L. 95%
Ketoprofen	240.2	201.8-280.7
Dexketoprofen	65.6	40.6-72.3

*C. dubia*. After 7-day exposure the cumulative mortality rate was 20% for ketoprofen at the 1000 µg/L, while a 20- and 40% mortality rate was observed for dexketoprofen at 100 and 1000 µg/L, respectively. Both pharmaceuticals showed effects on fecundity, showing a significant decrease in *C. dubia* exposed to 1000 µg/L (ketoprofen) and at 100- and 1000 µg/L (dexketoprofen). Data showed in table 2 and 3.

Table 2. Reproduction and survival of *Ceriodaphnia dubia* following a 7-day exposure to different concentrations of ketoprofen (Dunnett's test, \**P* <0.05).

	Ketoprofen ( µg/L)				
	Contr	1	10	100	1000
Time of first	4±0	4±0	4±0	4±0	4.3±0.
Offspring/female	23.3±	18.7±7.	21.2±	18.2±	17.5±4
Total reproduction	233	187	212	182	105
Mortality %	0	0	0	0	20

Table 3. Reproduction and survival of *Ceriodaphnia dubia* following a 7-day exposure to different concentrations of dexketoprofen (Dunnett's test, \**P* <0.05).

	Dexketoprofen ( µg/L)				
	Contr	1	10	100	1000
Time of first	4±0	4±0	4±0	4.4±0	4.6±0.
Offspring/female	20.5±	18.2±2.	17.4±	14.6±	11.2±1
Total reproduction	205	182	174	117	67
Mortality %	0	0	0	20	40

Cells exposed to ketoprofen and dexketoprofen produced differential effects on the CYP1A at transcriptional and functional levels (fig. 2A-B and 3A-B). Exposure to ketoprofen produced a significant increase of GST activity above control levels at 48 h, while after 72 h exposure no differences were observed. On the other hand, GST activity in dexketoprofen treated cells showed a significant decrease below control level at 72 h at all testes concentrations (Figure 2C and 3C). The mRNA abundance for MRP1 exhibited time and concentration-specific changes, significantly increasing at 48 and 72 h in cells treated with ketoprofen at 10, 100 and 1000 µg/L (Fig. 2D). The MRP2 mRNA expression was significantly increased after 72 h to 1000 µg/L (Fig. 2E). On the other hand, PLHC-1 cells treated with dexketoprofen produced an apparent

concentration and time-specific changes of MRP1 and MRP2 mRNA levels (Fig.3D-E).

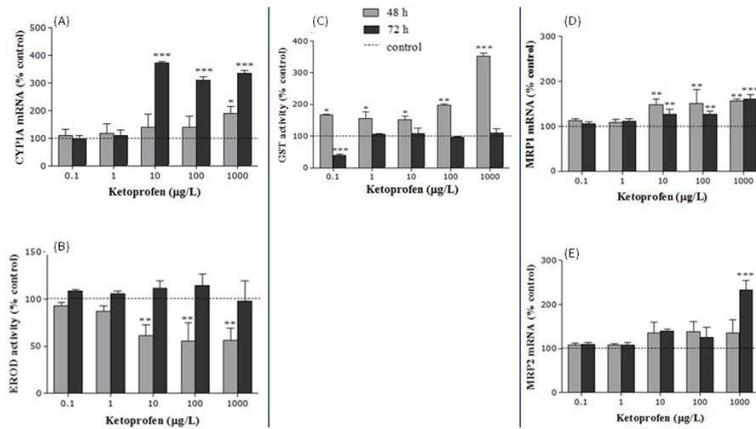


Fig. 2. (A) Transcript levels for CYP1A1, (B) EROD activity, (C) GST activity and transcript levels for MRP1 (D) and MRP2 (E) in PLHC-1 cell-line exposed to ketoprofen for 48 and 72 h. Data are expressed as percentage of control. (Dunnett's test, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n = 3$ ).

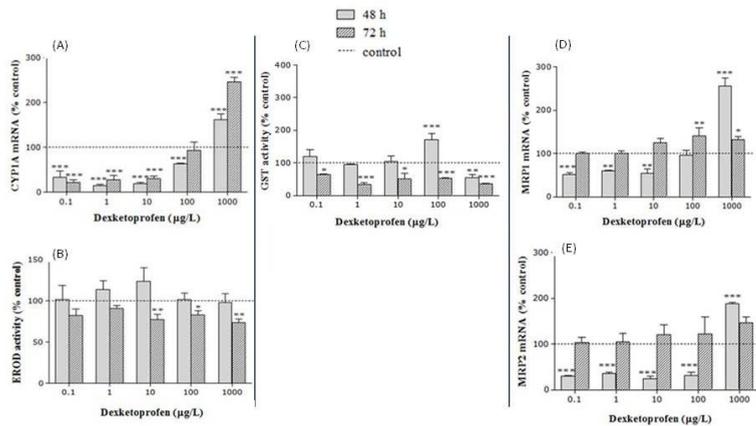


Fig. 3. (A) Transcript levels for CYP1A1, (B) EROD activity, (C) GST activity and transcript levels for MRP1 (D) and MRP2 (E) in PLHC-1 cell-line exposed to dexketoprofen for 48 and 72 h. Data are expressed as percentage of control. (Dunnett's test, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n = 3$ ).

## Discussion

Racemic mixture and corresponding enantiomers of a particular compound may have the same physical proprieties and abiotic degradation rate, but they often have different biological activity (Garrison, 2006). Few data are available in the literature about exposure to ketoprofen and

based on our knowledge, there are no available report that has used dexketoprofen in ecotoxicological testing. In our study, dexketoprofen was severely toxic with an EC<sub>50</sub> value at 100 times lower than what reported by Wiczerzah and colleagues (2016) using ketoprofen (118 mg/L). Our results showed an EC<sub>50</sub> value in *P.subcapitata* exposed to ketoprofen 16.7-fold lower than the lowest value reported in literature (Illès et al., 2004). Furthermore, the algal growth using *P. subcapitata* as model organism, showing that algae was more sensitive to dexketoprofen (EC<sub>50</sub>=65.6 µg/L). We observed that 50% inhibition effect produced by ketoprofen and dexketoprofen on algal growth required concentrations that are several orders of magnitude higher (50-100 times the EC<sub>50</sub>) than those currently reported in the environment (Fent et al., 2006). The chronic assay using *C. dubia* showed 20 % mortality in *C. dubia* at 1000 µg/L (ketoprofen) and respective 20- and 40% mortality at 100 and 1000 µg/L (dexketoprofen). These same concentrations also produced significant effects on reproduction rate. For example, 1000 µg ketoprofen decrease offspring/female ratio by 2.22-fold, while 100- and 1000 µg/L dexketoprofen produced respective 1.75- and 3.06-fold reduction. Ketoprofen and dexketoprofen produced reduction in CYP1A-mediated EROD activity may represent an adaptive control of drug bioavailability for optimal effects. Regardless, further investigations are needed to better understand the possible involvement of the CYP system in the metabolism and excretion of these pharmaceuticals. GST activity levels after exposure to ketoprofen produced elevated activity suggesting a possible conjugation with GSH. On the contrary, dexketoprofen significantly decreased GST activity. Although phase II enzymes are crucial in eliminating NSAIDs, the interaction between GST and our tested pharmaceuticals is poorly understood. Protein transporters have a fundamental role in eliminating toxic compounds from the body (Burk et al., 2005). Exposure to ketoprofen resulted in a significant increase of MRP1, while cells exposed to dexketoprofen showed different expression levels. However, although MRP expression has been demonstrated in several fish species (Caminada et al., 2008), only limited reports are available on the regulation of these proteins.

## ***Conclusion***

Ketoprofen and dexketoprofen were observed to act through different mechanisms within organisms and cells, probably as a consequence of their different rate of excretion. Bacterial and algal bioassays showed for dexketoprofen a higher toxicity than ketoprofen. In PLHC-1 cell model both NSAIDs interacted differently with CYP1A, GST and MRPs. Although both produced toxic effects at high concentrations, this study illustrates the importance of combining bioassays with key detoxification systems, describing different biological activities and pharmacokinetic properties of the two pharmaceuticals that are commonly detected in the environment.

## References

- Burk O, Arnold KA, Geick A, Tegude H, Eichelbaum M 2005. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem* 386: 503-513.
- Burke MD, Mayer RT. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2:583-588.
- Caminada D, Zaja R, Smital T, Fent K 2008. Human pharmaceuticals modulate P-gp1 (ABCB1) transport activity in the fish cell line PLHC-1. *Aquat Toxicol* 90: 214-222.
- Fent K, Weston AA, Caminada D 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76:122-159.
- Garrison AW 2006. Probing the Enantioselectivity of Chiral Pesticides. *Environ Sci Technol* 40(1):16-23.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 248:7130-7139.
- Illés E, Szabò E, Takács E, Wojnárovits L, Dombi A, Gajda-Schrantz K 2014. Ketoprofen removal by O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub>/UV processes: Kinetics, transformation products and ecotoxicity. *Sci Total Environ* 472: 178-184.
- 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.
- Khetan SK, Collins TJ 2007. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chem Rev* 107(6):2319-2364.
- US Environmental Protection Agency. 2002b. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 4th ed. EPA/821/R-02/013. Washington, DC.
- Wieczerezak M, Kudlak B, Yotova G, Nedyalkova M, Tsakovski S, Simeonov V, Namiesnik J 2016. Modeling of pharmaceuticals mixtures toxicity with deviation ratio and best-fit functions models. *Sci Total Environ* 571: 259-268.

# TOWARDS A SUMMARY OF ECOTOXICOLOGICAL KNOWLEDGE REGARDING THE MEDITERRANEAN *OSTREOPSIS CF. OVATA*

V. Giussani <sup>a</sup>, V. Piazza <sup>b</sup>, E. Costa <sup>c</sup>, F. Garaventa <sup>b</sup>, A. Dagnino <sup>e</sup>, R. Bertolotto <sup>e</sup>, E. Berdalet <sup>f</sup>, M. Vila <sup>f</sup>, S. Casabianca <sup>g</sup>, A. Penna <sup>g</sup>, M. Chiantore <sup>d</sup>, M. Faimali <sup>b</sup>

<sup>a</sup> ARPAL - Dip. Biotossicologia ambientale, via Fontevivo 21L, 19125 La Spezia, valentina.giussani@arpal.gov.it

<sup>b</sup> National Research Council – Institute of Marine Science (CNR-ISMAR), Genova - Via de Marini, 6 16149 Genoa, Italy. faimali@ge.ismar.cnr.it; francesca.garaventa@ismar.cnr.it; veronica.piazza@ge.ismar.cnr.it

<sup>c</sup> National Research Council – Institute of Marine Science (CNR-ISMAR), Arsenale - Tesa 104, Castello 2737/F, 30122 Venezia, Italy; elisa.costa@ve.ismar.cnr.it

<sup>d</sup> DISTAV – University of Genova, Corso Europa 26, 16132, Genova, Italy. chiantor@dipteris.unige.it<sup>e</sup> ARPAL - via Bombrini 8, 16149 Genova, Italy alessandro.dagnino@arpal.gov.it; rosella.bertolotto@arpal.gov.it

<sup>f</sup> Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC), Barcelona, Spain. berdalet@icm.csic.es, magda@icm.csic.es

<sup>g</sup> DISB – University of Urbino, Viale Trieste 296, 61121 Pesaro, Italy. silvia.casabianca@uniurb.it; antonella.penna@uniurb.it

---

**Abstract** -. Mediterranean Benthic Harmful Algal Blooms represent a phenomenon of particular interest and harmful proliferations of *Ostreopsis* spp. are increasing. During the last years several toxicological studies have been performed to assess the toxicity of this genus, highlighting that *O. cf. ovata* is the most toxic species, at least in the Mediterranean area. For this reason, it has been selected for an ecotoxicological investigation on different model organisms: crustaceans (larvae of *Amphibalanus amphitrite*, *Artemia salina*, *Tigriopus fulvus*), echinoderms (larvae and juveniles of *Paracentrotus lividus*), cnidaria (polyps and ephyrae of *Aurelia* sp.) and fish (juveniles of *Dicentrarchus labrax*). Our outcomes report a different sensitivity to *O. cf. ovata* of all tested organisms and improve data availability for the risk assessment of exposure to *Ostreopsis* by using, for example, the “Species Sensitivity Distributions (SSDs)” approach.

Keywords: *Ostreopsis*, Harmful Algal Blooms, Ecotoxicology, marine organisms

## ***Introduction***

Mediterranean Benthic Harmful Algal Blooms (B-HABs) represent a phenomenon of special interest since proliferation of three species belonging to *Ostreopsis* genus are occurring, in particular: *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Ostreopsis* cf. *siamensis* and *Ostreopsis* *fattorussoi*. Among them, *O. cf. ovata* is the most common and toxic (Accoroni et al. 2016), producing palytoxin and ovatoxins that cause palytoxicosis in humans (Berdalet et al. 2015) and several harmful effects in marine organisms. Like other benthic microalgae, *O. cf. ovata* produces variable amount of mucilage which can be used to attach to several substrates, such as macrophytes, rocks, sand.

In past years, *Ostreopsis* toxicity, in particular by using monospecific algal culture and natural mixtures of its toxins, has been investigated; however, in the last years several ecotoxicological bioassays have been performed, by using both standard and new model organisms, with the general aim to define EC50, sublethal effects and to better understand the toxic mechanisms of this benthic dinoflagellate.

This work reports a summary of the main outcomes which stemmed from our studies, providing a preliminary application in the Risk Assessment by using the Species Sensitivity Distribution (SSD) approach.

## ***Material and methods***

### *Ostreopsis* cf. *ovata* cultures

Laboratory cultures of *O. cf. ovata* were obtained from environmental samples collected during the summer 2012 in Quarto dei Mille (Genoa, NW Mediterranean Sea, Italy). Cell isolation was performed at the laboratory of University of Urbino from the team of Dr. Antonella Penna. Algal cells were cultured into several 200 ml sterilized plastic flasks closed with transpiring caps, filled with an aliquot of *O. cf. ovata* culture from the masters added with filtered (GF/F 0.22  $\mu$ m) sterilized marine water and Guillard growth medium F/2 (at a concentration of 1 ml l<sup>-1</sup>).

### Ecotoxicological bioassays

Detailed informations regarding experimental protocols are provided in the following references: Faimali et al. (2012), Privitera et al. (2012), Giussani et al. (2015) and (2016).

## ***Results***

Results, in term of EC50 values related to ecotoxicological bioassays with whole culture of *O. cf. ovata* performed at ISMAR-CNR (Genoa), are shown in table 1. Detailed data related also to other treatments of algal culture (6 and 0.2  $\mu$ m mesh size filtrated growth medium free of algal cells, resuspended culture in fresh medium and resuspended and

sonicated culture) are reported in Faimali et al. (2012), Privitera et al. (2012), Giussani et al. (2015) and (2016).

In general, significant toxic effects (in term of mortality and/or immobility) were due to the contact with the whole culture, especially for *A. salina* and *Aurelia* sp. Ephyrae, that reported very low EC50 values (<4 and 7.31 cells/ml respectively). Other algal culture treatments caused minor or none harmful effects, although the 6 mesh size filtered growth medium (free of algal cells but containing part of *O. cf. ovata* mucus) provided slight toxic effect.

Other organisms, such as *A. amphitrite*, *T. fulvus*, *P. lividus* and *D. labrax*, were affected only when they were exposed to very high concentrations of *O. cf. ovata* cells. Polyps of *Aurelia* sp. did not show any significant negative effect, showing higher resistance compared to their planktonic life stages.

*Table 1. Toxic effects (EC50) on several model organisms exposed to O. cf. ovata whole culture collected during late stationary phase or natural samples (\*\*\*) collected during O. cf. ovata bloom of July 2010 in Quarto dei Mille (Genoa, Italy). Exposition lasted for 24 and 48 h at 20 °C, unless indicated.*

Model organisms	End point	EC <sub>50-24 h</sub> cells/ml (cells/mL)	EC <sub>50-48 h</sub> cells/ml
<i>Aurelia</i> sp. (ephyrae)	Immobility	10.50	7.31
<i>Aurelia</i> sp. (polyp)	Mortality	no effect	no effect
<i>A. salina</i> (nauplii)	Mortality	>4000	12.43
<i>A. salina</i> (nauplii)	Mortality	>400	<4
<i>A. salina</i> (nauplii)	Mortality	15.11**	<6**
<i>Tigriopus fulvus</i>	Mortality	>4000	1486.74
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	Mortality	>4000	1416.95
<i>P. lividus</i> (competent larvae)	Mortality	>4000	1820
<i>P. lividus</i> (juveniles)	Mortality	-	168
<i>Dichentratus labrax</i> (juvenile)	Mortality	679.09**	540.71

## Discussion

Mediterranean B-HABs, so far, are mainly represented by *O. cf. ovata* blooms which turned out to be the most toxic species among *Ostreopsis* spp. in the area (Tartaglione et al. 2016).

Results provided by ecotoxicological bioassays performed on several marine model organisms (crustaceans nauplii, jellyfish ephyrae and polyps, echinoderm larvae and juveniles, fish juveniles) highlight that both *A. salina* nauplii and *Aurelia* sp. ephyrae are strongly sensitive to the direct contact with algal culture, while the only growth medium (devoid of cells) slightly impact on all tested organisms. However, the mucilage filaments produced by the dinoflagellate showed to play a role as a vehicle for its toxins to external environment and/or potential preys, suggesting the presence of an active toxic mechanism (Giussani et al. 2015).

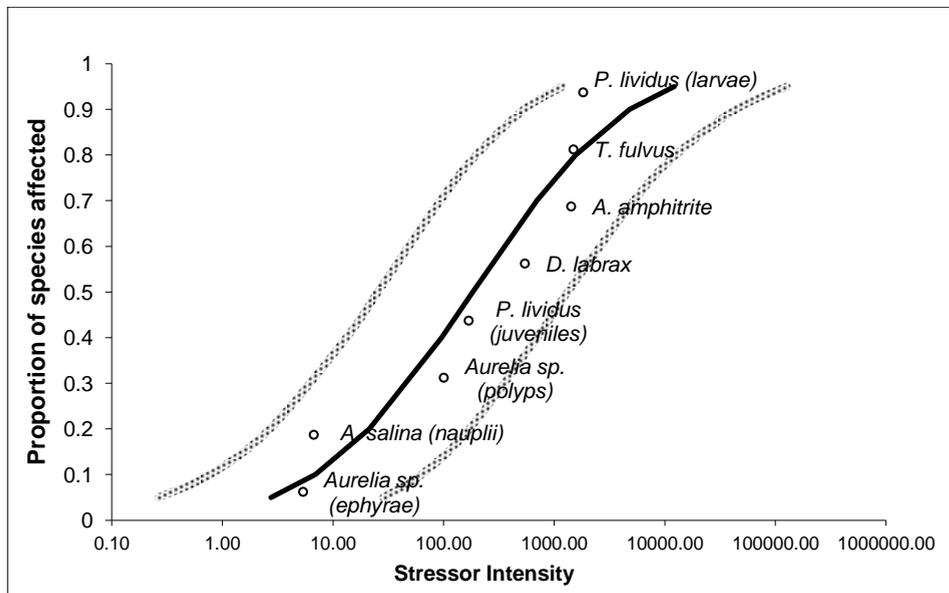
All results provided by these studies have been obtained by using algae cultures and adopting very similar protocols, turning out in greatly comparable values.

These data are useful for the risk assessment of Mediterranean *O. cf. ovata* by using, for example, the Species Sensitivity Distribution, and a preliminary example of this application is shown in chart 1. This is, indeed, a statistical model used to generate risk predictions which may be confirmed by site specific data, to quantify stressor-response relationships or to compare site data with lab ones (more details are provided on the site <http://www3.epa.gov>).

### Conclusion

Studies cited in this work greatly improve knowledge regarding *O. cf. ovata* toxicity and can provide a preliminary database, later amplified with other values, useful for the Risk Assessment of *Ostreopsis*.

Chart 1. Species Sensitivity Distribution (SSD) plot related to  $EC_{50-48h}$  for marine organisms exposed to live cells of *O. cf. ovata* at 20 °C. Black line: central tendency; dotted grey line: prediction interval (95%).



### Aknowlegments

Authors would like to thanks all students those who participated in these experimental activities.

## References

- Accoroni S, Romagnoli T, Penna A, Capellacci S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Abboud-Abi Saab M, Giussani V, Asnaghi V, Chiantore M., Totti C 2016. *Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea. *Journal of Phycology*. Dec 1;52(6):1064-84.
- Berdalet, E., Fleming, L.E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L.C., Moore, S.K., Enevoldsen, H., Hoagland, P., 2015. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315415001733>.
- Faimali M, Giussani V, Piazza V, Garaventa F, Corrà C, Asnaghi V, Privitera D, Gallus L, Cattaneo-Vietti R, Mangialajo L, Chiantore M 2012. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Marine environmental research*. May 31;76:97-107.
- Giussani V, Costa E, Pecorino D, Berdalet E, De Giampaulis G, Gentile M, Fuentes V, Vila M, Penna A, Chiantore M, Garaventa F, Lavorano S, Faimali M 2016. Effects of the harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on different life cycle stages of the common moon jellyfish *Aurelia* sp. *Harmful Algae*. Jul 31;57:49-58.
- Giussani V, Sbrana F, Asnaghi V, Vassalli M, Faimali M, Casabianca S, Penna A, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Mazzeo A, Chiantore M 2015. Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae*. Apr 30;44:46-53.
- Privitera D, Giussani V, Isola G, Faimali M, Piazza V, Garaventa F, Asnaghi V, Cantamessa E, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M 2012. Toxic effects of *Ostreopsis ovata* on larvae and juveniles of *Paracentrotus lividus*. *Harmful Algae*. Jun 30;18:16-23.
- Tartaglione L, Mazzeo A, Dell'Aversano C, Forino M, Giussani V, Capellacci S, Penna A, Asnaghi V, Faimali M, Chiantore M, Yasumoto, T 2016. Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: structural insights into four new ovatoxins by LC-HRMS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(3), pp.915-932. <http://www3.epa.gov>

# ACUTE AND SHORT-TERM TOXICITY OF 12 ADDITIVES FOR MECHANIZED TUNNELING

by D. Baderna<sup>a</sup>, F. Cinà<sup>a</sup>, R. Croce<sup>a</sup>, A. Lombardo<sup>a</sup>, A. Passoni<sup>a</sup>, R. Bagnati<sup>a</sup>, M. Lodè<sup>a</sup>, S. Sforzini<sup>b</sup>, E. Benfenati<sup>a</sup>,

<sup>a</sup> Laboratory of Environmental Chemistry and Toxicology, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - diego.baderna@marionegri.it / anna.lombardo@marionegri.it / emilio.benfenati@marionegri.it

<sup>b</sup> Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica - Università del Piemonte Orientale - susanna.sforzini@uniupo.it

---

**Abstract** - Different conditioning agents are used worldwide to enhance the performance of tunnel boring machines for the mechanized tunneling. Surfactants and polymers are often added also to preserve from wear and cutter blocks. As a byproduct of the process are obtained several tons of rocky debris contaminated by conditioning agents listed above. In recent years, the excavated rocks have been considered a source of possible environmental concern due to the facts that these materials are recycled as road fill material, the coverage area of rocky areas or river banks. A preliminary study conducted recently by our group highlighted the toxicity of three commercial additives at concentrations comparable to those used to the excavations previously done in Italy. The study presented here examines eight commercial surfactants and 4 polymers through a multidisciplinary approach designed to determine the reference threshold concentrations. The chemical composition of technical mixtures was determined by high resolution mass spectrometry and the major chemical components were then analyzed *in silico* to highlight the potential similarity with pollutants already normed. Finally, the toxicity of the different agents was evaluated by assays with daphnids, algae and watercress.

**Keywords:** *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lepidum sativum*, surfactants, mechanized tunneling

## **Introduction**

Tunnel boring machines (TBMs) are used worldwide for the mechanized tunneling tunnels and ducts. Different additives are added during the excavation to enhance the tunneling process and to preserve the TBM. The most used additives are surfactants and polymers that are used with the purpose of aggregating rock debris produced by tunneling, facilitating their removal from the excavation front and conveying them on the conveyor belt.

The most common surfactants are synthetic detergents containing alkyl or glycols while polyacrylates or polyacrylamides are the most used polymers.

Both additives are not "consumed" during the excavation and therefore are found in the excavated rocks that have been historically disposed of as waste, with a great economic impact.

More recently, the excavation rocks have been used as filling material for road or river embankments and as a cover of rocky areas, becoming a possible source of environmental concern. A preliminary study conducted recently by our group on three commercial additives used in TBM showed toxic effects on the aquatic ecosystem at concentrations of surfactants comparable to those used in some excavations in Italy.

The study examines eight commercial surfactants and four polymers by means of a multidisciplinary approach designed to determine the possible contamination thresholds.

The approach includes the chemical characterization of technical mixtures of surfactants, *in silico* analysis of the ingredients to highlight the potential structural similarity with pollutants and toxicants already regulated and, finally, the toxicity evaluation of different additives using daphnids, algae and cress as target organisms.

### ***Materials and Methods***

8 surfactants and 4 polymers were investigated in this study. Commercial formulation from different suppliers were tested. 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). Ramified tetradecyl hydrogen sulphate was used as internal standard. IR spectrometry was used for polymers characterization.

For the *in silico* similarity search, the identified compounds were chosen as test set and the compounds from Italian law D.Lgs 152/2006 as training set. The in-house standalone application *istSimilarity* v.1.0.5 was used to perform the similarity analysis, returning the 3 most similar chemicals of the second dataset for each compound of the first one, on the basis of a similarity index (S.I.). The similarity index ranges from 0 (no similarity) to 1 (maximum similarity, i.e. identity).

The 48h immobilization bioassays with crustaceans *Daphnia magna* and the microplate-based algal growth inhibition assay with *Pseudokirchneriella subcapitata* were performed with artificial mediums containing different concentration of conditioning agents. Algal density were measured using a TC20™ Automated Cell Counter and selecting the effect on biomass (72h EbC50) as endpoint. The acute 72h phytotoxicity test was done with seeds of cress (*Lepidium sativum*) using OECD standard soils contaminated with different concentration of selected products. 72h growth index was selected as endpoint, accounting of germination rate and root elongation.

### ***Results***

The chemical analysis of the surfactants identified 15 molecules, belonging to the class of alkylsulphates, common to all the products analyzed. The most frequent and abundant are the decyl sulfate, dodecyl

sulfate and the tetradecyl sulfate. Table 1 show the 15 selected compounds measured in the surfactant products.

The chemical characterization of the surfactants showed that common indicator compounds are present in different proportions within the different products and also in different batches of the same product.

In the three polymers, the IR analysis showed the presence of water-soluble C11-C13, C12-C15 and C14-C18 hydrocarbons, including some polyacrylates.

The *in silico* analysis revealed no structural similarity with regulated compounds in the Environment Consolidated Act. Moreover, the indicator compounds are, however, generally similar to each other.

*Table 1: Compounds measured in the surfactants*

ID	Name
1	decyl hydrogen sulfate
2	dodecyl hydrogen sulfate
3	2-(dodecyloxy)ethyl hydrogen sulfate
4	2-[2-(dodecyloxy)ethoxy]ethyl hydrogen sulfate
5	2-[2-[2-(dodecyloxy)ethoxy]ethoxy]ethyl hydrogen sulfate
6	tetraoxatetracosan-1-ylhydrogen sulfate
7	pentaoxaheptacosan-1-yl hydrogen sulfate
8	hexaoxatriacontan-1-yl hydrogen sulfate
9	heptaoxatritriacontan-1-yl hydrogen sulfate
10	octaoxahexatriacontan-1-yl hydrogen sulfate
11	tetradecyl hydrogen sulfate
12	2-(tetradecyloxy)ethyl hydrogen sulfate
13	2-[2-(tetradecyloxy)ethoxy]ethyl hydrogen sulfate
14	2-[2-[2-(tetradecyloxy)ethoxy]ethoxy]ethyl hydrogen sulfate
15	3,6,9,12-tetraoxahexacosan-1-yl hydrogen sulfate

Figure 1 shows the results of the aquatic toxicity studies with daphnids and algae used as model of freshwater community. Concentration-response studies were done with both the organisms to evaluate the no observed adverse effects concentration (NOAEC) and the LC50 for surfactants and polymers.

Results of phytotoxicity test with cress seeds are shown in figure 2. Tested concentrations for surfactants 0-20 g/kg while for polymers the range was 0 - 1 g/kg. also for the terrestrial toxicity, a concentration-response study was done for each product, deriving both the NOAEC and the LC50 values.

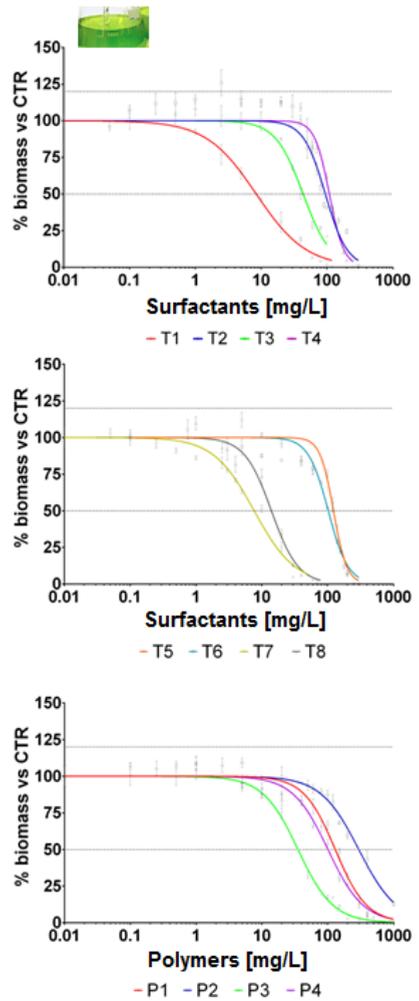
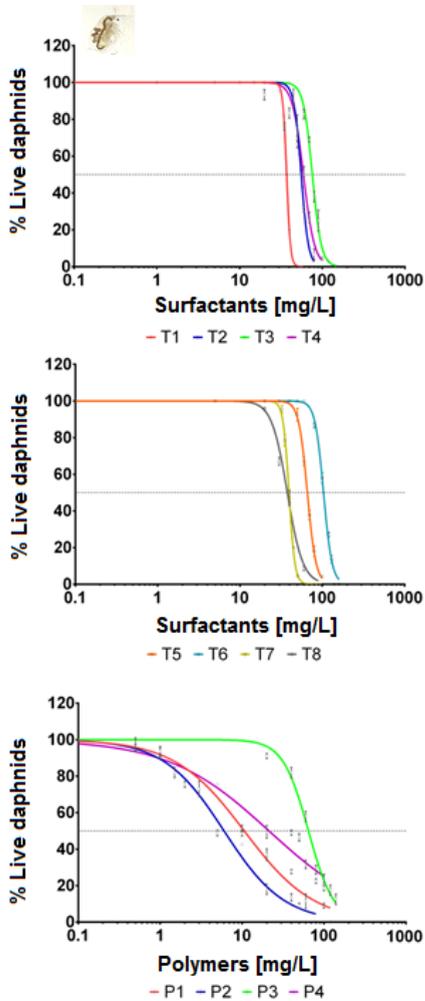


Figure 1: Results of the aquatic toxicity assays: 48h daphnid immobilization assay (left) and 72h algal growth assay (right)

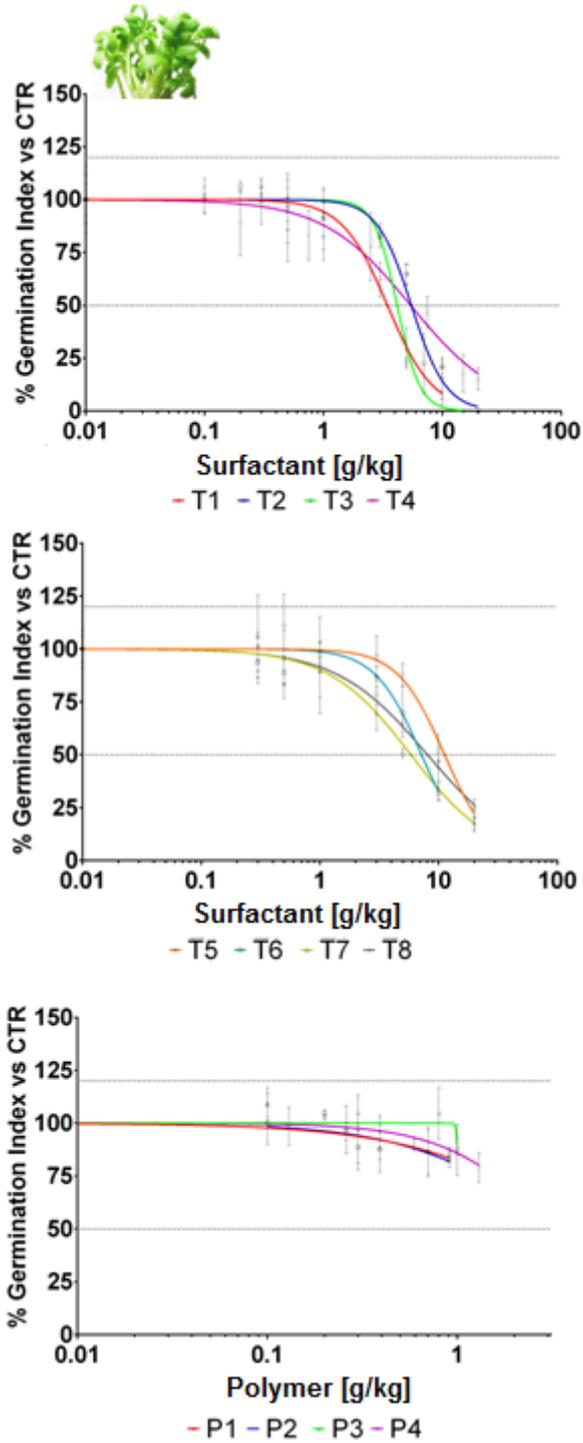


Figure 2: Results of the terrestrial toxicity assays with cress seeds

### ***Discussion and conclusions***

Fifteen compounds related to decyl-, dodecyl and tetradecyl hydrogen sulphate were identified by high resolution chemical characterization of surfactants. These compounds are common to all the formulations but they are present with different patterns in the products. Polyacrilates were instead found in the polymers.

The chemical analysis presented in this work enhances the approach previously adopted by our group that identified 8 indicators compounds. The 7 new molecules include decyl hydrogen sulphate, 4 (poly)ethoxylated derivatives of dodecyl hydrogen sulphate and 2 from tetradecyl hydrogen sulphate.

We performed an *in silico* structure similarity analysis to find compounds most similar to the identified ones selecting for comparison several pollutants with reference limits defined by the Italian Environmental Act. This analysis revealed no structural similarity among the 15 identified compounds with compounds from the Italian Environment Consolidated Act, suggesting that none of the limits set by current national regulations may be adopted for these molecules on the basis of a structural similarity. Daphnids, algae and cress seeds were used to investigate the potential ecotoxicity of the selected additives. Acute and short term effects were selected as endpoints. Focusing on daphnids assays, most of the additives has 48hIC50 values lower than 100 mg/L and, so, they can be classified as toxic according to REACH and CLP legislations.

It is also important to point out that all the additives tested could be toxic for the aquatic communities at concentrations that could be theoretically found in the leachates of excavated rock we studied (range between 10 and 50 mg/L). In fact, these concentrations are higher than NOAEC for algae and daphnids and are often comparable to IC50 values observed in our study.

However, NOAEC and IC50 values for plant after short-term exposure to both surfactants and polymers were respectively higher than 1 g/kg and 5 g/kg. It follows that the concentrations previously found in the debris from excavation (0.1 - 0.5 mg/kg for the additives and <0.1 mg/kg for the polymers) were not able to inhibit the germination and elongation of the radicles/emergences, so they can be considered not toxic for the plants.

### ***Bibliography***

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.

Bellopede, R., F. Brusco, P. Oreste and M. Pepino, 2011. Main aspects of tunnel muck recycling. *Am. J. Environ. Sci.*

Tokgoz, 2013. Use of TBM excavated materials as rock filling material in an abandoned quarry pit designed for water storage. *Eng. geology*.

Baderna D., Lomazzi E., Passoni A., Pogliaghi A, Petoumenou M.I., Bagnati R., Lodi M., Viarengo A, Sforzini S, Benfenati E, Fanelli R., 2015. Chemical characterization and ecotoxicity of three foaming agents used in mechanized tunneling. *J. Haz. Mater.* 296:210-220.

# OLD MOLECULES, NEW CHALLENGES: ACUTE AND SHORT-TERM AQUATIC TOXICITY OF TEXTILE DYES

by R. Croce<sup>a</sup>, F. Cinà<sup>a</sup>, F. Albanese<sup>a</sup>, C. Cappelli<sup>a</sup>, M. Viar<sup>a</sup>, A. Lombardo<sup>a</sup>, D. Baderna<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Environmental Chemistry and Toxicology -  
diego.baderna@marionegri.it / anna.lombardo@marionegri.it

---

**Abstract** -. Dyes are widely used in various sectors such as textile dyeing, paper printing, photography, pharmaceutical, food and cosmetic industries. In addition, it is estimated that more than 10% of total dyes produced is lost to waste streams. Most of these compounds pass conventional wastewater treatment processes and are released into the environment where they persist for a long time because of their high stability to light or temperature and their resistance to water or detergent degradation. These features, coupled with their toxicity, make dyes a possible source of ecological concern, particularly for freshwater aquatic ecosystems. Dyes are often poorly characterized and toxicological/ecotoxicological data are available only for a few. Therefore, new data may be very useful for their risk assessment. In the present study, we investigated the aquatic toxicity of 42 commercial dyes using the application of *in silico* tools and ecological bioassays. The *in silico* approach was used to assess the similarities among the dyes. Acute and short-term ecotoxicological assays with daphnids and algae were applied to evaluate the potential impact of these products. The bioassays were able to identify structures with potential ecotoxicity but, in our experimental conditions, algae were more sensitive to dye toxicity, particularly when the effects on biomass were considered.

Keywords: *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, azodyes, aquatic toxicity, dyes

## *Introduction*

Dyes are substances providing color to a substrate. They differ in terms of chemical structure, dyeing process, solubility and application fields, but they all contain chromophores, the structure responsible for the different dye colors. The most widespread chromophores are the azo, anthraquinone, methine, nitro, arylmethane and carbonyl functional groups. These substances are widely used in textile dyeing, paper printing and other sectors such as photography, pharmaceuticals, food and cosmetic industries.

Dyes can be classified in many different ways, according to the production methods, to their chemical structure or to the applications in which they are used. Focusing on the chemical classification, textile dyestuffs can generally be grouped into 11 categories or classes: acid, azoic, basic, direct, disperse, fiber reactive, mordant, solvent, sulphur and vat dyes and optical/fluorescent brighteners.

The amount of dyes produced in the world per year have been estimated at over 10,000 tons and most were used by the textile industry. About 12% of the dyes is lost to waste streams. Most of these compounds pass the conventional wastewater treatment processes and are released into the environment in which they persist for a long time because of their high stability to light or temperature and their resistance to water or detergents degradation. They are hardly biodegraded under environmental conditions, in particular azo dyes, the largest group. These features, coupled with their toxicity, make dyes an important source of ecological concern for both humans and ecological receptors. Knowledge of the physical, chemical and application properties of dyes can provide valuable information about the dyes environmental release and impacts. Dyes are often poorly characterized and toxicological/ecotoxicological data are available only for few dyes. Therefore, new data are very useful for risk assessment of dyes. We investigated the aquatic toxicity of 42 commercial dyes by an *in silico* approach and ecological bioassays. *In silico* tools were used to assess the similarity among the selected dyes. Acute and short-term ecotoxicological assays with daphnids and algae were applied to evaluate the potential impact of these products and to provide data required by the REACH legislation for the registration of these products already on the market.

## ***Materials and Methods***

42 products with different color index and different chemical classification in order to investigate the variability of commercially available dyes. Acid, direct, disperse, mordant, reactive and VAT dyes were selected.

An *in silico* approach was applied to determine the chemical similarity of the selected dyes using the in-house standalone application *istSimilarity* v.1.0.5. This software returns the *k* most similar chemicals of the second dataset for each compound of the first one, on the basis of a similarity index (S.I.). The similarity index ranges from 0 (no similarity) to 1 (maximum similarity, i.e. identity).

The crustacean *D. magna* was used as freshwater model for acute studies of the investigated agents. The 48h immobilization bioassay was done according to the OECD guideline 202, using a Daphtoxkit F™ magna. Dye solutions or their water accommodated fractions (WAFs) at different concentrations were added to the exposure chambers. The immobilization of daphnids was recorded daily. 24h and 48h LC50 were derived by non linear regression analysis. The results of the limit test were used to classify dyes: dyes with 48h LC50 higher than 100 mg/L were considered "non-toxic" while those with 48h LC50 values lower than 100 mg/L were classified as "toxic".

The 72h algal growth inhibition test with *Pseudokirchneriella subcapitata* was done according to OECD 201 and ISO 8692 guidelines with slight modifications. Plates were incubated for 72 h at 25±1 °C on an orbital

shaker (90 rpm) in a thermostatic chamber. Light was provided by a 2W LED Unit for each plate. Algal density was measured with a TC20™ Automated Cell Counter. Results were expressed as effect on biomass (EbC50) and on growth rate (ErC50). The procedure was used for both limit tests and concentration-response studies. For the limit tests, algae were exposed to each dyes at 100 mg/L. Dyes with 72h NOEbC higher than 100 mg/L were considered “non-toxic” while dyes with 72h NOEbC lower than 100 mg/L were considered “potentially toxic” and further investigated with a full dose-response curve. Finally, only dyes with 72 ErC50 lower than 100 mg/L were classified as “toxic” according to the OECD guideline.

## Results

*In silico* methods were used to investigate the chemical structure similarity of the dyes. Figure 1 show the similarity matrix of the selected compounds.

The acute aquatic toxicity was investigated with the 48h daphnid immobilization assay, performing both limit test and concentration-response studies for more toxic compounds.

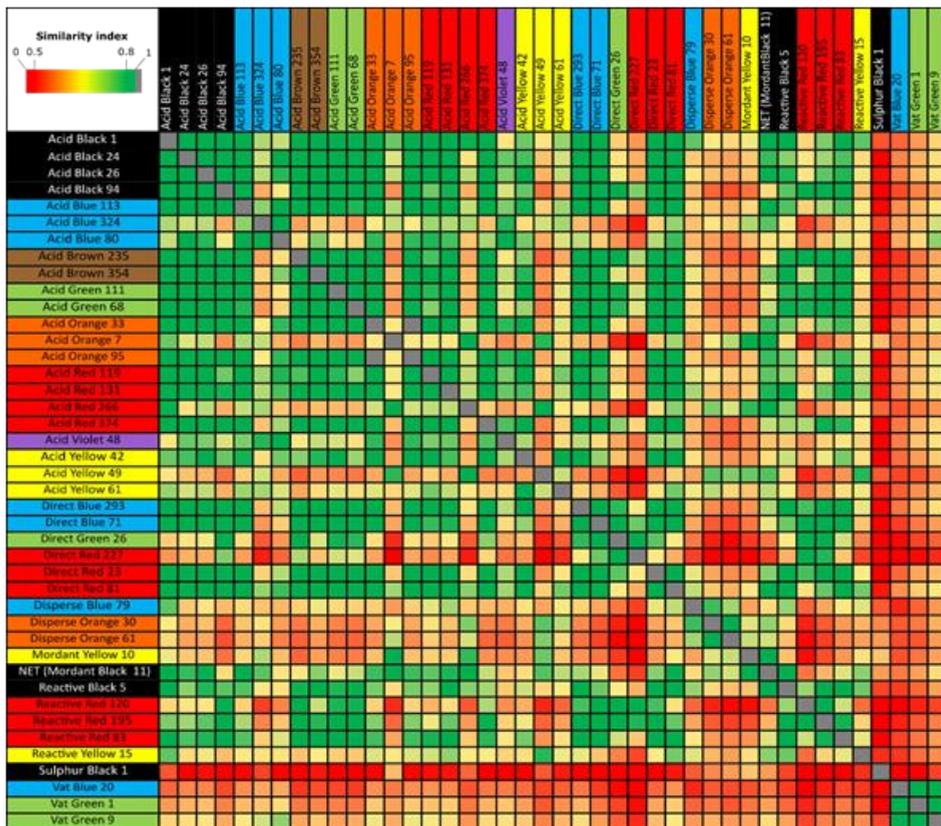
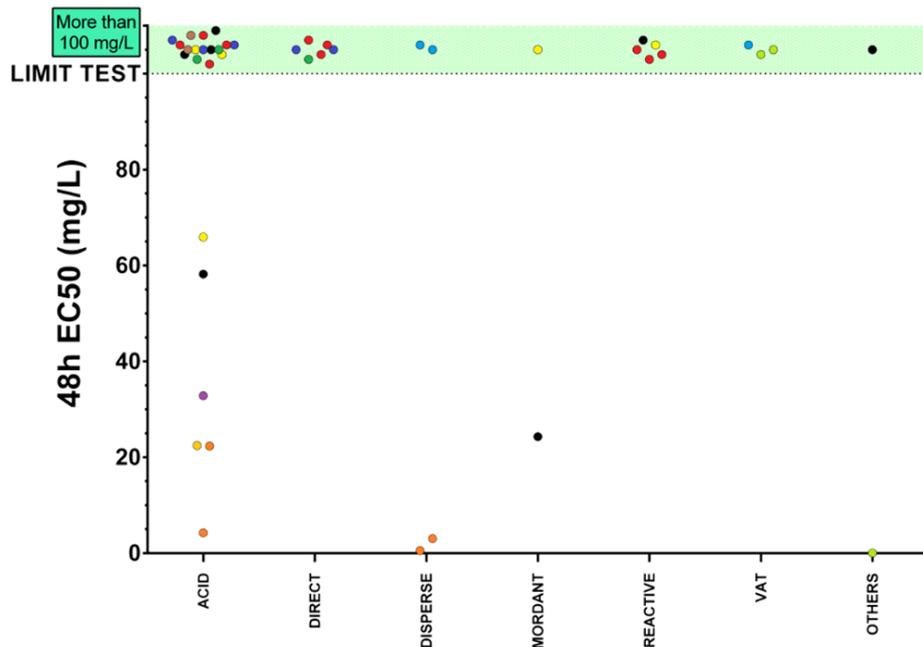


Figure 1: Similarity matrix of the 42 investigated dyes.

34 compounds have 48 h LC50 higher than 100 mg/L while 8 compounds have 48h LC50 values lower than 100 mg/L and, consequently, a concentration-response study was required (Figure 2). The short-term aquatic toxicity was investigated with the 72h algal growth inhibition assay. Preliminary limit tests at 100 mg/L were done for each dye (Figure 3). The threshold for the limit test was 72h NOEC > 100 mg/L, selecting effects on biomass as endpoint (72h NOEbC). All the dyes had 72h NOEbC lower than 100 mg/L, so we did a full concentration-response deriving the 72h ErC50 (growth rate) and 72h EbC50 (biomass).

### Discussion

Textile dyes are a very heterogeneous family of compounds. They are produced and used worldwide but only a limited number of data about the toxicity of these substances is present in literature. The present work investigated the acute and short-term aquatic toxicity of more than 40 commercially available dyes using both *in silico* approaches and bioassays with algae and daphnids. The chemical structure similarity of the dyes was investigated *in silico*, showing that most of the dyes have high similarity to other dyes from the same chemical class. We applied the 48h immobilization assay with *Daphnia magna* to investigate the acute toxicity of the dyes using a two-step approach which includes a limit test and a concentration-response study.



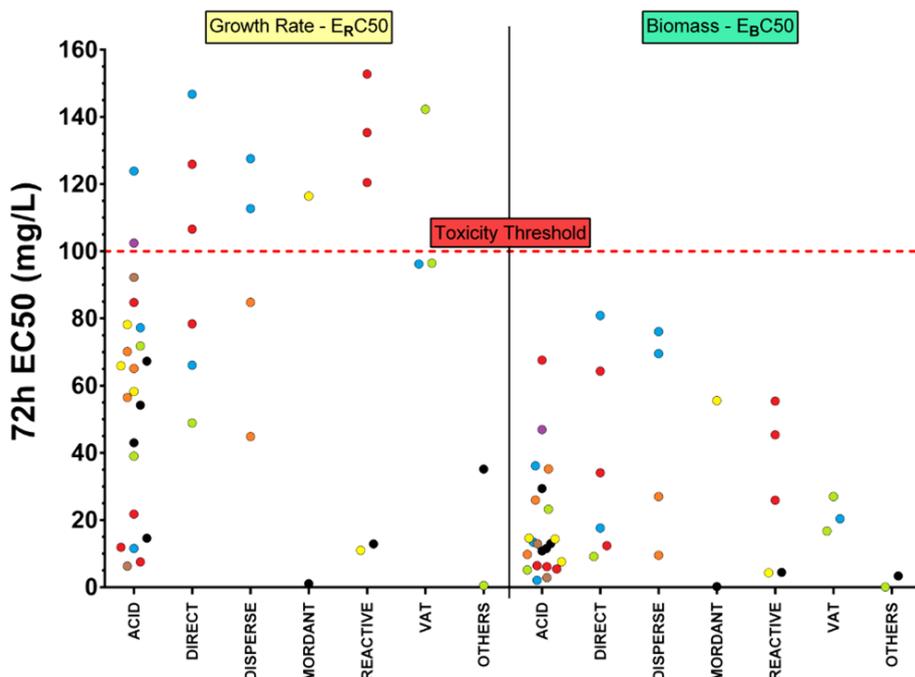


Figure 3: Results of the 72h algal growth assay

According to the OECD 202 guidelines and to CLP criteria, the classification of dyes was based on the result of the limit test at 100 mg/L and selecting the 48h LC50 higher than 100 mg/L as threshold. In our experimental conditions, 34 compounds have been classified as “non-toxic” and 8 compounds resulted “toxic” (48h LC50 < 100 mg/L). Short-term toxicity was investigated using the 72h growth inhibition assay with *P. subcapitata* for both limit test and concentration-response studies. The effects on biomass (EbC50) and growth rate (ErC50) were considered to calculate the 72h EC50. In our opinion, the endpoint derived directly from the algal density is more suitable for the assessment of pollutant toxicity because it is more conservative and detects low but significant adverse effects. For these reasons, we selected the biomass as threshold parameter for the limit test (72h NOEbC > 100 mg/L). In our experimental conditions, 72h NOEbC values were lower than 100 mg/L for all 42 compounds that can be consequently classified as “potentially toxic”. Dose-response study for each dye were done. Adopting the threshold of 72h EC50 > 100 mg/L based on growth rate (ErC50), 30 dyes could be classified as “toxic” and 12 as “non-toxic”, while all the dyes were classified as “toxic” by the algal assay in our experimental conditions considering the effects on biomass (EbC50 from 0.2 to 80 mg/L). Algae therefore seems to be the most sensitive model for dyes toxicity.

## ***Conclusions***

The lack of information about their toxicity makes synthetic dyes a potential source of environmental concern, particularly for freshwater aquatic ecosystems. The present work investigated the toxicity of more than 40 commercial dye formulations, including the most used chemical categories. Acute and short-term data were obtained for *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, according to their relative guidelines. In both cases, the assays were able to identify structures with potential ecotoxicity but, in our experimental conditions, algae were more sensitive to dye toxicity, particularly if the effects on biomass are considered. These results should be useful not only for assessment of the selected dyes but also for the development of new QSAR models for the aquatic toxicity or for upgrading the existing models, considering both general models on daphnids and algae and specific models for dye toxicity.

## ***Acknowledgements***

The authors would like to thank the EU LIFE+ project PROSIL (LIFE12 ENV/IT/ 000154) for the financial support and the DYE STAFF consortium for the supply of dyes.

## ***Bibliography***

Floris M., Manganaro A., Nicolotti O., Medda R., Magiatordi G.F., Benfentati E., 2014. A generalizable definition of chemical similarity for read-across. *Journal of Cheminformatics*, 6:39.

OECD, 2002. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264078406-en>.

OECD, 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069947-en>

OECD, 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069923-en>.

# PBT: UN NUOVO STRUMENTO PER LO SCREENING DELLE SOSTANZE.

by A. Lombardo<sup>a</sup>, A. Manganaro<sup>b</sup>, C. I. Cappelli<sup>a</sup>, M. I. Petoumenou<sup>a</sup>, F. Albanese<sup>a</sup>, A. Roncaglioni<sup>a</sup>, E. Benfenati<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Via La Masa 19, 20159 Milano, Italy - [anna.lombardo@marionegri.it](mailto:anna.lombardo@marionegri.it); [claudia.cappelli@marionegri.it](mailto:claudia.cappelli@marionegri.it); [maria.petoumenou@marionegri.it](mailto:maria.petoumenou@marionegri.it); [federica.albanese@marionegri.it](mailto:federica.albanese@marionegri.it); [alessandra.roncaglioni@marionegri.it](mailto:alessandra.roncaglioni@marionegri.it); [emilio.benfenati@marionegri.it](mailto:emilio.benfenati@marionegri.it)

<sup>b</sup> Kode s.r.l. - Via Nino Pisano 14, 56122 Pisa, Italy - [a.manganaro@kode-solutions.net](mailto:a.manganaro@kode-solutions.net)

---

**Abstract** - Le sostanze persistenti (P), bioaccumulabili (B) e tossiche (T) destano particolare preoccupazione per gli eventuali rischi ambientali che possono provocare. Con lo scopo di proteggere l'ambiente, il regolamento europeo per la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e restrizione delle sostanze (noto come REACH) ha introdotto la valutazione di queste tre proprietà per i composti prodotti o importati in quantitativi pari o superiori alle 10 t/a. E' stato sviluppato un metodo integrato, basato su relazioni struttura-attività quantitative e qualitative (note come modelli (Q)SAR) che valuta queste tre proprietà indipendentemente per poi combinarle in un unico indice (compreso tra 0 e 1) che permette di ordinare i composti dal più pericoloso al più sicuro. La prima versione di questo strumento, disponibile gratuitamente attraverso il software VEGA (<http://www.vega-qsar.eu/>), sarà aggiornata e migliorata introducendo nuovi modelli e strumenti.

Keywords: persistenza, bioaccumulo, tossicità, REACH, *in silico*

## *Introduzione*

Il REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals; REACH, 2006) è un regolamento europeo che concerne tutte le sostanze chimiche che hanno un mercato nell'Unione Europea. Con lo scopo di ridurre i rischi per l'uomo e l'ambiente, il REACH prevede due screening, uno per valutare i potenziali rischi per l'uomo, noto come CMR, e uno per valutare la pericolosità ambientale, noto come PBT/vPvB. Perché un composto risulti CMR deve poter essere classificato come cancerogeno (C), mutageno (M) o tossico per la riproduzione (R), secondo le soglie stabilite dalla normativa. Un composto che risulta persistente (P), bioaccumulabile (B) e tossico (T), sempre secondo le soglie stabilite dalla normativa, viene indentificato come PBT, mentre i composti che risultano molto persistenti (vP) e molto bioaccumulabili (vB) come vPvB. I composti CMR e PBT/vPvB devono essere sottoposti a valutazioni più approfondite.

Il REACH, inoltre, prevede l'utilizzo di tutti i metodi disponibili per la valutazione della pericolosità della sostanza, inclusi i modelli *in silico*, metodi basati cioè su modelli matematici e statistici al fine di ridurre i tempi, i costi e il numero di animali da utilizzare per la valutazione e la prioritizzazione di un gran numero di sostanze chimiche (van Wijk et al., 2009; Dimitrov et al., 2014; Howard and Muir, 2010). Tra questi metodi ci sono i modelli (quantitativi) struttura-attività, noti come (Q)SAR ((quantitative) structure-activity relationship), e modelli basati sulla similarità come il read-across e il chemical grouping.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati alcuni metodi per la valutazione PBT tra cui il "PBT Profiler" (<http://www.pbtprofiler.net>) e il PBT index (Papa and Gramatica, 2010; Cassani et al., 2015, Gramatica et al., 2015; Gramatica et al., 2016).

Il presente lavoro ha due obiettivi. Il primo è la presentazione dell'implementazione in un'applicazione Java di uno schema basato su approcci *in silico* per la valutazione PBT precedentemente sviluppato nell'ambito del progetto "PRioritization Of chemicals: a METHodology Embracing PBT parameters into a Unified Strategy" (PROMETHEUS) e recentemente pubblicato (Manganaro et al., 2016; Pizzo et al., 2016a; Pizzo et al., 2016b; <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/prometheus-prioritization-of-chemicals-a>). Il secondo obiettivo è la presentazione di uno schema generale di un nuovo sistema di screening che sarà realizzato nell'ambito del progetto "Joining environmental, ecotoxicological and toxicological Assessment of chemical substances with Non-testing methods within a Unified Screening" (JANUS).

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

I dati e i metodi utilizzati sono descritti in: Manganaro et al., 2016; Pizzo et al., 2016a; Pizzo et al., 2016b. Brevemente, sono stati costruiti nuovi modelli ed utilizzati modelli esistenti in un approccio basato sull'evidenza per valutare ciascun parametro (P, B e T) indipendentemente. Ad ogni parametro è associata la valutazione dell'incertezza della predizione. I risultati dei tre parametri sono stati normalizzati ed integrati in un unico indice compreso tra 0 (non PBT) e 1 (PBT) utilizzando la teoria nota come Multi-Criteria Decision-Making (MCDM; Pavan and Todeschini, 2008).

Per valutare le performance del sistema è stato utilizzato un set di 79 composti per i quali era disponibile una classificazione PBT (inclusi nell'ECHA candidate list) o dati sperimentali sufficienti per una classificazione. Sono state calcolate accuratezza, sensibilità, specificità e il Matthews correlation coefficient (MCC). Le prestazioni sono anche state confrontate con altri due indici esistenti: il PBT profiler e il PBT index.

Il sistema sviluppato nel progetto PROMETHEUS è stato implementato in un'applicazione stand-alone Java (JDK versione 7) chiamata PROMETHEUS. Questa applicazione utilizza le librerie open-source di VEGA (<http://www.vega-qsar.eu/>), a loro volta basate sulle librerie open-source CDK (Chemistry Development Kit) per processare le molecole fornite in input ed ottenere le predizioni da tutti i modelli necessari (disponibili in VEGA). La versione grafica è basata sul framework SWING.

## Risultati

Per valutare le performance in classificazione è stata utilizzata una soglia di 0.5 per l'indice finale: valori maggiori di 0.5 indicano che il composto è PBT, minori di 0.5 che non lo è (NPBT). Questa soglia è arbitraria ed è stata utilizzata solo per poter poi confrontare i risultati con altri strumenti disponibili.

È stato calcolato l'indice per i 79 composti del test e questi sono poi stati ordinati secondo il risultato, da quelli con il valore dell'indice più alto a quelli con il valore più basso. Una visualizzazione parziale dell'ordinamento è rappresentato in Figura 1. Tutti i composti classificati come PBT/vPvB hanno un indice maggiore di 0.5, e tutti i composti classificati come NPBT hanno un indice minore di 0.5. Le statistiche sono riportate nelle Tabelle 1 e 2 attraverso la matrice di confusione, l'accuratezza, la sensibilità, la specificità e il MCC. La tabella 2 riporta anche un confronto con il PBT profiler e il PBT index.

L'applicazione PROMETHEUS fornisce valutazioni separate per i tre parametri P, B e T, insieme alla valutazione dell'affidabilità della valutazione (in uno score da 0 a 1 dove 1 indica massima affidabilità) e la valutazione finale con due indici: il primo basato su tutti e tre i parametri, il secondo solo su P e B. Il log Kow viene valutato separatamente.

L'applicazione calcola automaticamente tutti i modelli inclusi nella piattaforma VEGA. I modelli non implementati in VEGA devono essere calcolati a parte. Il file di input richiede la struttura di ciascun composto sotto forma di SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System). Alle strutture possono essere aggiunte informazioni relative ad eventuali dati sperimentali disponibili e/o i risultati dei modelli esterni a VEGA. L'applicazione è in grado di funzionare sia con le informazioni aggiuntive che senza.

Molecule identification		LogKow		PERSISTENCE		logBCF		TOXICITY (mg/l)		Ranking	
CAS	Remarks	Prediction	Reliability	Prediction	Reliability	Prediction	Reliability	Prediction	Reliability	Des(PBT)	Des(PB)
1046-71-7	PBT/vPvB (EC list)	0.60	0.8	NP	0.7	1.1	1	3.20E-03	0.1	0.749	0.792
120-12-7	PBT (EC list)	4.45	0.8	vP	1	3.26	1	6.00E-02	0.6	0.734	0.792
1163-19-5	PBT/vPvB (EC list)	6.03	0.4	vP	0.7	3.38	0.8	4.29E-05	0	0.773	0.780
81854	vPvB (EC list)	2.45	0.4	NP	0.7	3.86	1			0.786	0.786
56-35-9	PBT (EC list)	4.05	0.4	not available	0.5	3.99	1	3.00E-03	0.3	0.665	0.663
335-67-1	PBT (EC list)	4.10	0.4	PvP	0.9	3.12	1	2.41E-01	0.4	0.611	0.663
3825-26-1	PBT (EC list)	4.10	0.4	PvP	0.9	3.12	1	2.41E-01	0.4	0.611	0.663
25973-69-1	PBT/vPvB (EC list)	7.25	0.8	NP	0.7	2.91	0.4	9.62E-03	0.1	0.590	0.594
176-06-7	vPvB (EC list)	8.83	0.4	PvP	0.9	1.82	0.4	9.80E-04	0.4	0.581	0.471
7820-94-8	vPvB (EC list)	8.16	0.4	PvP	0.9	1.34	0.4	1.69E-03	0.4	0.515	0.472
3058-94-8	vPvB (EC list)	8.82	0.4	PvP	0.9	1.53	0.4	1.33E-02	0.4	0.512	0.487
135257-19-9	PBT (EC list)	5.99	0.4	not available	0.5	2.57	0.4	3.04E-03	0.4	0.505	0.465
678970-15-5	PBT (EC list)	5.99	0.4	not available	0.5	2.57	0.4	3.04E-03	0.4	0.505	0.465
678970-16-6	PBT (EC list)	5.99	0.4	not available	0.5	2.57	0.4	3.04E-03	0.4	0.505	0.465
138257-18-8	PBT (EC list)	5.99	0.4	not available	0.5	2.57	0.4	3.04E-03	0.4	0.505	0.465
678970-17-7	PBT (EC list)	5.99	0.4	not available	0.5	2.57	0.4	3.04E-03	0.4	0.505	0.465
109102-67-2	PBT (EC list)	5.99	0.4	not available	0.5	2.57	0.4	3.04E-03	0.4	0.505	0.465
107-84-1	vPvB (EC list)	7.49	0.4	PvP	0.9	1.47	0.4	1.33E-02	0.4	0.505	0.478
825-86-6	non PBT	3.20	1	vP	0.4	1.77	0.80	1.22E+00	0.7	0.412	0.449
75-25-2	non PBT	2.40	0.8	vP	1	1.22	1	6.99E-01	0	0.401	0.380
127-18-4	non PBT	3.40	0.8	PvP	1	1.84	1	1.18E+00	0.9	0.396	0.437
76-23-6	non PBT	2.39	0.8	vP	0.7	1.11	0.9	6.45E-01	0.7	0.368	0.371
102-06-7	non PBT	2.74	0.8	PvP	0.7	1.30	1	1.13E+00	0.5	0.338	0.341
76-06-2	non PBT	2.09	0.8	NP	1	0.47	0.4	1.03E-03	0.8	0.332	0.263
122008-86-9 (122008-78-0)	non PBT	4.61	0.8	PvP	0.4	0.88	0.9			0.329	0.296
115-90-2	non PBT	2.23	0.8	vPvP	0.7	0.84	0.7	4.34E-01	0.9	0.327	0.321
1912-24-9	non PBT	2.61	0.8	vP	1	0.90	1	9.99E-01	0.7	0.326	0.330
87-02-9	non PBT	1.68	0.8	PvP	0.7	0.45	0.80	1.51E-01	0.9	0.310	0.281
75-09-2	non PBT	1.25	0.8	vP	1	1.37	1	3.11E+01	0.9	0.305	0.405
115-02-1	non PBT	1.91	0.8	PvP	1	0.86	1	2.90E+00	0.5	0.301	0.302
97-58-3	non PBT	1.97	0.8	vP	0.7	1.11	1	5.41E+00	0.5	0.290	0.287
1055-11-7	non PBT	1.61	0.8	vP	1	1.39	1	3.53E+00	0	0.280	0.280

Figura 1. Risultati di PROMETHEUS su parte dei 79 composti testati.

Tabella 1. Prestazioni del sistema PROMETHEUS

		PROMETHEUS		
		NPBT	PBT	n.p.*
Valore sperimentale	NPBT	61	0	0
	PBT	0	18	0

\*Non predetto.

Tabella 2. Confronto tra PROMETHEUS, PBT profiler e PBT index

	PROMETHEUS	PBT	PBT index
<b>Accuratezza</b>	<b>1.00</b>	<b>0.87</b>	<b>0.95</b>
<b>MCC</b>	<b>1.00</b>	<b>0.64</b>	<b>0.86</b>
Sensibilità	1.00	0.47	0.89
Specificità	1.00	1.00	0.97

### Discussione

Grazie al progetto PROMETHEUS è stato possibile sviluppare un sistema di valutazione per un ampio numero di composti in modo da individuare i composti che risultano maggiormente pericolosi per l'ambiente in accordo con la valutazione PBT così come previsto dal REACH. Le prestazioni di questo schema sono risultate ottime, anche confrontate con altri indici già noti ed utilizzati (che hanno comunque delle buone prestazioni).

PROMETHEUS nasce con lo scopo di ordinare i composti in base alla loro pericolosità secondo il PBT. È quindi possibile processare diverse molecole insieme per ottenere l'indice PBT e quindi ordinare i composti secondo la loro pericolosità, ma consente anche di valutare i singoli parametri P, B e T separatamente. Gli altri metodi analizzati non consentono in modo automatico entrambe le modalità: il PBT profiler consente di valutare singolarmente i parametri ma processa un composto per volta, mentre il PBT index consente di processare più composti insieme ma fornisce solo una valutazione PBT integrata.

Grazie al seguito di PROMETHEUS, JANUS, è stata implementata un'applicazione stand-alone in Java che è disponibile su richiesta e a breve sarà disponibile sul sito <http://www.vega-qsar.eu/>. L'applicazione, essendo sviluppata in Java, risulta cross-platform e facilmente utilizzabile sia su piattaforme Windows che Linux, sia nella sua versione a linea di comando, sia nella versione grafica.

Nel progetto JANUS è previsto lo sviluppo di un nuovo schema per la valutazione PBT che includa anche la valutazione CMR (vedi Figura 2). Infatti, un composto CMR è automaticamente considerato T. La valutazione per il parametro T sarà migliorata aggiungendo la valutazione della tossicità su *Daphnia magna* e alghe. Se si renderanno disponibili anche dei dati relativi alla tossicità terrestre verranno sviluppati modelli *ad hoc*. La valutazione della persistenza, al momento qualitativa, sarà migliorata con modelli quantitativi. Il log Kow verrà integrato direttamente nella valutazione del parametro B. Verrà anche preso in considerazione il

metabolismo: il metabolismo microbico nella valutazione della P, quello nel pesce per T e B ed, infine, il metabolismo nei mammiferi per il CMR. Alla valutazione PBT (sempre attraverso un indice) verrà anche affiancata la valutazione relativa agli interferenti endocrini (ED).

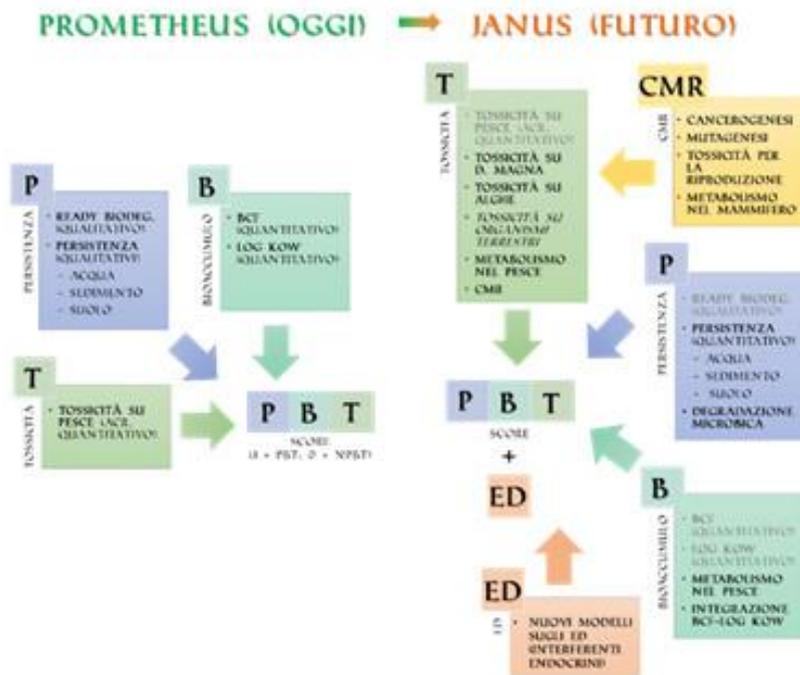


Figura 2. Confronto tra lo schema generale di PROMETHEUS e quello di JANUS. In grassetto sono indicate le proprietà non incluse nello schema precedente, mentre in corsivo quelle ancora da valutare.

### Conclusioni

È stato sviluppato uno schema per la valutazione della pericolosità ambientale secondo il REACH. Questo schema è stato testato dando ottime prestazioni ed è stato implementato in un'applicazione Java standalone disponibile gratuitamente al sito <http://www.vega-qsar.eu/>. Lo schema verrà ulteriormente migliorato integrando nuove proprietà (come la tossicità per *Daphnia magna* e le alghe) e aggiungendo nuove valutazioni (come il metabolismo o il CMR). Anche il nuovo schema sarà implementato in un'applicazione che sarà gratuitamente disponibile.

### Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare il progetto "Prioritization of chemicals: a methodology embracing PBT parameters into a unified strategy (PROMETHEUS) research ID: 3713 63 414, business ID: Z 6-80 710/5 by Umweltbundesamt (UBA)" e il "German Federal Ministry for the

Environment, Nature Conservation, Building and Nuclear Safety” per il progetto JANUS (FKZ 3716 65 4140).

### ***Bibliografia***

Cassani S, Gramatica P 2015. Identification of potential PBT behavior of personal care products by structural approaches. *Sustain Chem Pharm* 1: 19–27.

Dimitrov S, Veith G, Mekenyan O 2014. Application of in Silico Metabolism and Environmental Degradation Data to Support Chemical PBT Assessment. In: *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics*. 1: 1-22.

Gramatica P, Cassani S, Sangion A 2016. Are some “safer alternatives” hazardous as PBTs? The case study of new flame retardants. *J Hazard Mater* 306: 237–246.

Gramatica P, Cassani S, Sangion A, 2015. PBT assessment and prioritization by PBT Index and consensus modeling: Comparison of screening results from structural models. *Environ Int* 77: 25-34.

Howard P, Muir DG 2010. Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce. *Environ Sci Technol* 44: 2277–2285.

Manganaro A, Pizzo F, Lombardo A, Pogliaghi A, Benfenati E 2016. Predicting persistence in the sediment compartment with a new automatic software based on the k-Nearest Neighbor (k-NN) algorithm. *Chemosphere* 144: 1624-1630.

Papa E, Gramatica P 2010. QSPR as a support for the EU REACH regulation and rational design of environmentally safer chemicals: PBT identification from molecular structure. *Green Chem* 12: 836-843.

Pavan M, Todeschini R 2008. Scientific Data Ranking Methods Theory and Applications. *Data Handling in Science and Technology* 27, 1-213.

Pizzo F, Lombardo A, Manganaro A, Benfenati E 2016a. A new integrated in silico strategy for the assessment and prioritization of persistence of chemicals under REACH. *Environ Int* 88: 250-260.

Pizzo F, Lombardo A, Manganaro A, Cappelli CI, Petoumenou MI, Albanese F, Roncaglioni A, Brandt M, Benfenati E 2016b. Integrated in silico strategy for PBT assessment and prioritization under REACH. *Environ Res* 151: 478–492.

REACH 2006. Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals (REACH) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December.

van Wijk D, Chenier R, Henry T, Hernando MD, Schulte C 2009. Integrated Approach to PBT and POP Prioritization and Risk Assessment. *Integr Environ Ass Manag* 5: 697-711.

# IMPLEMENTAZIONE DI UNA STRATEGIA DI INDAGINE INTEGRATA PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE CAUSE DI STRESS NEGLI AMBIENTI ACQUATICI

by V. Pellegrini, A. Buschini, A. Suppa, G. Gorbi

Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 11/A, 43124 Parma

[valeriopellegrini@gmail.com](mailto:valeriopellegrini@gmail.com); [gessica.gorbi@unipr.it](mailto:gessica.gorbi@unipr.it);

[antonio.suppa@studenti.unipr.it](mailto:antonio.suppa@studenti.unipr.it); [annamaria.buschini@unipr.it](mailto:annamaria.buschini@unipr.it)

---

**Abstract** - Lo stato ecologico è la risultante delle pressioni che insistono su una sezione di un corpo idrico, quali immissioni di nutrienti, contaminazione da sostanze tossiche e alterazioni idromorfologiche. In ambito gestionale è quindi importante avere a disposizione metodi di indagine che consentano di distinguere le diverse pressioni per attuare azioni mirate al miglioramento della qualità. Nel presente studio è stata valutata la capacità diagnostica di una strategia di monitoraggio integrata applicata ad un corso d'acqua di un bacino pilota (Val Parma). Sono stati utilizzati saggi tossicologici (acuti e cronici), genotossicologici (Comet Assay) e tossicogenomici (RT-qPCR) su *Daphnia magna*, affiancati all'analisi della struttura delle comunità di macroinvertebrati bentonici. Gli organismi sono stati esposti *in vivo* a campioni prelevati in sezioni del corpo idrico a monte e a valle della immissione dell'effluente di scarico di un impianto di trattamento di acque reflue urbane ed industriali.

Parole chiave: ambienti acquatici, monitoraggio, *Daphnia magna*, test cronico, Comet Assay, RT-qPCR

## Introduzione

La Direttiva Quadro sulle Acque [Water Framework Directive (WFD) 2000/60] dà mandato a tutti gli stati membri di proteggere gli ecosistemi acquatici e di gestire i corpi idrici in modo ecologicamente sostenibile al fine di raggiungere buone condizioni chimiche ed ecologiche delle acque superficiali entro il 2015, termine attualmente dilazionato al 2025. La stessa direttiva richiedeva a tutti gli stati membri una valutazione dello stato effettivo dei corpi idrici, sia dal punto di vista ecologico che chimico, entro il 2004. Le valutazioni effettuate secondo la WFD hanno rivelato che il 40% dei corpi idrici superficiali sono classificabili "a rischio" secondo la terminologia della Direttiva. Lo stato ecologico (ES) è la risultante delle pressioni che insistono su una sezione di un corpo idrico, quali immissioni di nutrienti, contaminazione da sostanze tossiche e alterazioni idromorfologiche. In ambito gestionale è quindi importante avere a disposizione metodi di indagine che consentano di distinguere le diverse pressioni per attuare azioni mirate al

miglioramento della qualità. La valutazione dello stato chimico (CS), che nell'ambito della WFD è basato principalmente su 53 sostanze prioritarie, considera solo una parte delle possibili sostanze tossiche e non rivela tutte le possibili situazioni e cause di stress ecotossicologico a cui un corpo idrico può essere soggetto (Altenburger et al., 2015). E' inoltre da sottolineare che negli ambienti acquatici sono generalmente presenti miscele di contaminanti che possono costituire un rischio ecologico non prevedibile sulla base dei livelli di contaminazione delle singole sostanze. Per superare queste difficoltà nella valutazione/prevenzione del rischio e nella conseguente corretta gestione dei corpi idrici serve pertanto un approccio multidisciplinare in grado di integrare le evidenze ottenute con diverse metodologie (es. analisi chimico-specifica, analisi della struttura delle comunità biotiche, studi basati sull'analisi degli effetti a diversi livelli dell'organizzazione biologica) (Suter II, 2002; de Zwart et al., 2009; Martinez-Haro et al., 2015; Wernersson et al., 2015) ed identificare, ove possibile, le probabili cause perturbative. In Figura 1 è riportato il "flow-chart" di un monitoraggio investigativo. Nei casi 1 e 3 le azioni da attuare possono risultare evidenti, mentre nel caso 2 si impone la necessità di attuare valutazioni in grado di discriminare fra le possibili cause e/o poterne escludere alcune. L'analisi degli effetti può essere realizzata mediante numerose metodiche diverse (una disamina approfondita su questo aspetto è riportata da Wernersson et al., 2015) che devono essere idonee alle finalità dello studio ed ai vari passi dell'indagine, quali identificazione delle fonti di contaminazione, identificazione delle sostanze inducenti la perturbazione, verifica della rimozione delle cause di stress. Per quanto sia ormai riconosciuta la necessità di utilizzare una batteria di test, manca ancora una precisa indicazione del complesso di saggi e di endpoint da utilizzare nei diversi contesti del monitoraggio investigativo dei corsi d'acqua.

Con il lavoro svolto ci siamo proposti di applicare al monitoraggio dei corsi d'acqua una serie di saggi effect-based (tossicologici, genotossicologici e tossicogenomici) utilizzando la specie modello *Daphnia magna* e verificarne la capacità diagnostica. Lo studio ha riguardato i corsi d'acqua della Val Parma. Le sezioni analizzate sono state scelte sulla base delle classi di qualità derivate da serie storiche di dati chimico-fisici e/o dall'analisi della struttura delle comunità bentoniche, in modo da poter valutare la risposta degli endpoint utilizzati in condizioni di pressione antropica diversificate.

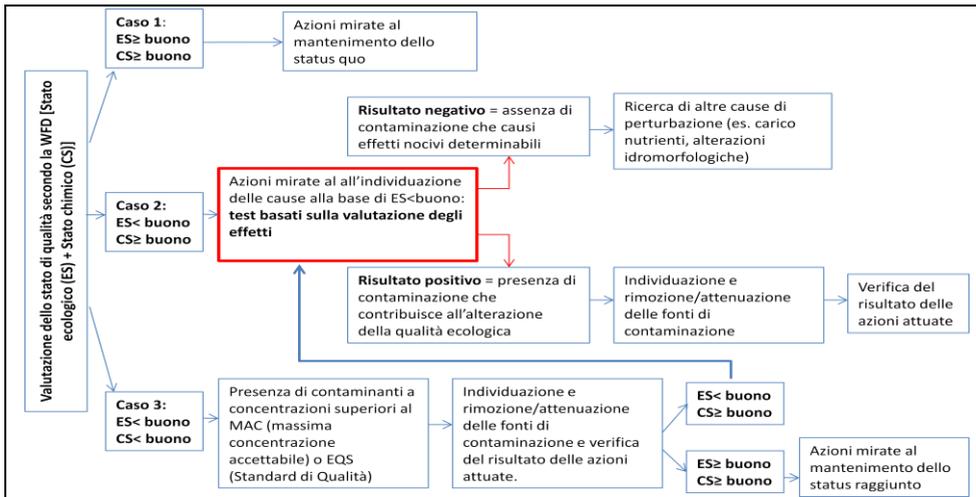


Figura 1: Flow-chart di un monitoraggio investigativo finalizzato alla gestione/recupero dei corsi d'acqua dal punto di vista della qualità biologica.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni prelevati in diverse sezioni di un corso d'acqua del reticolo idrografico minore interessato dallo scarico di un impianto di depurazione di acque reflue urbane e industriali. Gli impianti di depurazione, utili per l'abbattimento del carico organico delle acque reflue, sono tuttavia anche considerati una delle più frequenti fonti puntiformi di contaminazione delle acque superficiali (Brooks et al., 2006). Il corso d'acqua analizzato è stato quindi considerato un utile caso di studio per valutare la capacità dei diversi test effect-based di discriminare fra situazioni diversificate dal punto di vista delle possibili pressioni di origine antropica.

## Materiali e metodi

### Sezioni analizzate e campionamento

Il corpo idrico preso in considerazione, Canale Naviglio Navigabile, è un corso d'acqua del reticolo idrografico minore, nella pianura a nord della città di Parma, e scorre in una zona interessata da numerosi insediamenti industriali. Lungo il suo corso riceve l'effluente di scarico del depuratore Est di Parma e sfocia nel Torrente Parma pochi Km prima che questo si immetta nel Fiume Po. Sono state individuate tre sezioni per le quali sono di seguito riportati ES e CS ove disponibili (ARPA-PR 2014; nr = non riportato):

Stazione 1: situata circa 1 Km a monte dell'immissione dello scarico del depuratore; ES = cattivo; CS = buono;

Stazione 2: situata circa 600 m a valle dell'immissione dello scarico del depuratore; ES = nr; CS = nr;

Stazione 3: situata circa 11 Km a valle dell'immissione dello scarico del depuratore; ES = cattivo; CS = buono.

In ogni stazione è stato prelevato, nello stesso giorno, un singolo campione puntuale (25 litri) con taniche in PET. Sui campioni sono stati

misurati pH e conducibilità entro 2 ore dalla raccolta. Contemporaneamente al prelievo delle acque, sono stati effettuati campionamenti quantitativi di macroinvertebrati bentonici per l'analisi della struttura della comunità ed il calcolo dell'Extended Biotic Index (EBI).

#### Saggi effect-based con *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera)

Gli organismi sono stati allevati in laboratorio secondo il metodo APAT – IRSA CNR (2003) in acqua naturale.

Sui campioni tal quali sono stati effettuati saggi a breve termine (48 h di esposizione) con neonati di *D. magna* (età ≤ 24 h; tre repliche e 10 individui per replica) per verificare l'assenza di tossicità acuta.

I campioni sono stati quindi filtrati (0,45 µm), per eliminare la eventuale presenza di fonti alimentari addizionali, e conservati a 4° C fino al momento del loro utilizzo per i saggi di tossicità cronica e genotossicità e per la valutazione dell'attività trascrizionale dei geni selezionati.

Il saggio di tossicità cronica (21 gg; test statico con rinnovo a giorni alterni) è stato realizzato utilizzando come fonti alimentari l'alga verde unicellulare *Pseudocirrhosia subcapitata* (3 x 10<sup>5</sup> cell/ml) ed il lievito *Saccharomyces cerevisiae* (3 x 10<sup>5</sup> cell/ml). Per eliminare il mezzo di coltura prima dell'utilizzo per l'alimentazione, le colture algali sono state centrifugate (2000 g per 10 min), lavate e risospese in acqua di allevamento dei dafnidi. Per ciascun campione e per il controllo sono stati utilizzati 10-15 neonati (età ≤ 24 h) mantenuti singolarmente in un volume pari a 100 ml. Come controllo di laboratorio è stata usata la stessa acqua naturale utilizzata per l'allevamento, arricchita con gli oligoelementi indicati per la preparazione del mezzo artificiale ELENDT M4 (OECD, 2012). Giornalmente è stata registrata la sopravvivenza e la presenza di uova nella camera incubatrice fino al raggiungimento dell'età riproduttiva e, ad ogni rinnovo del mezzo acquoso, è stato contato il numero di neonati prodotti (sia vivi che morti) e di uova abortite. Come endpoint sono stati quindi considerati: % di sopravvivenza al 21° giorno, età media alla riproduzione, fecondità (= n° di neonati vivi per femmina sopravvissuta fino al 21° giorno) e Failed Development % (FD%) calcolato nel modo seguente:

$FD\% = (n^{\circ} \text{ uova abortite} + n^{\circ} \text{ neonati non vitali}) / (n^{\circ} \text{ neonati vivi} + n^{\circ} \text{ uova abortite} + n^{\circ} \text{ neonati non vitali})$

Il test è stato ritenuto valido se il controllo di laboratorio rispettava i criteri di validità indicati dalla OECD 211 Guideline (2012), cioè un n° medio di neonati vivi (per femmina sopravvissuta fino al 21° giorno) ≥ 60 (CV% ≤ 25%) e mortalità degli organismi ≤ 20%.

I saggi genotossicologici (Comet Assay) sono stati effettuati secondo il metodo descritto da Pellegri et al. (2014). Come endpoint è stata considerata la Tail Intensity % (TI%), il cui valore aumenta all'aumentare del danno al DNA.

Per i saggi tossicogenomici sono stati utilizzati dafnidi di età compresa fra 72 e 96 h. Gli organismi sono stati esposti ai campioni ambientali (50 individui in 200 ml) per 48 h in assenza di alimento. Dopo esposizione, gli organismi sono stati congelati e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA. L'estrazione è stata effettuata con il kit GeneJET RNA Purification Column (Thermo Fisher) dopo disintegrazione degli organismi mediante shock meccanico con amalgamatore (TAC 200/S – Linea TAC s.r.l., Asti, Italia; frequenza di oscillazione = 4200 strokes/min)

in presenza di microsferi di vetro ( $\varnothing = 0.45 - 0.50$  mm) e di soluzione tampone. La concentrazione dell'RNA nell'estratto è stata determinata con spettrofotometro Thermo Scientific NanoDrop 2000. La sintesi del cDNA è stata realizzata mediante SensiFASTcDNA Synthesis kit (Bioline). Ogni reazione di RT-qPCR è stata eseguita in tre repliche utilizzando Thermo Scientific SYBR Green come rivelatore di fluorescenza. I primers per i singoli geni [vitellogenina 1 (vtg1), cuticola 12 (cut12), carbossipeptidasi A1 (cpa1) ed emoglobina 1 (dhb1)], riportati da Soetaert et al.(2007a), sono stati forniti dalla ditta Primm srl (Milano, Italia). I geni selezionati sono biomarker di riproduzione (vtg1), accrescimento (cut12, cpa1) e stress generale (dhb1). L'alterazione dell'attività trascrizionale dei vari geni, espressa come Fold Change (FC), è stata considerata come endpoint. Valori di FC nel range 2,0 - 0,5 sono stati considerati variazioni dovute a risposte di acclimatazione degli organismi; valori di FC >2,0 o <0,5 sono stati considerati variazioni dovute alla up-regolazione o alla down-regolazione, rispettivamente, del gene considerato.

### ***Risultati e discussione***

In tabella 1 sono riportati risultati ottenuti dal test cronico, dal Comet Assay e dall'analisi della struttura della comunità macrobentonica.

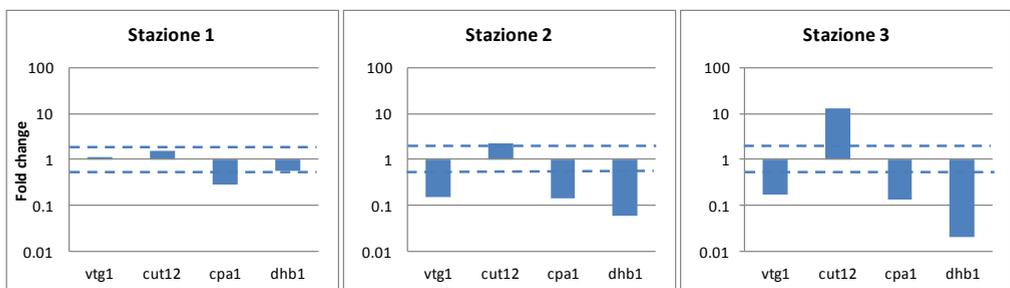
L'indice EBI è risultato molto basso e uguale in tutte le stazioni campionate segnalando una compromissione dello stato qualitativo sia della sezione a monte dello scarico del depuratore che delle sezioni a valle, in accordo con il giudizio sullo stato ecologico riportato da ARPA-PR (2014).

I risultati del test cronico e del Comet Assay con *Daphnia magna* hanno invece indicato significative differenze fra le stazioni. Gli organismi esposti al campione prelevato nella sezione a monte dello scarico del depuratore (Stazione 1) hanno mostrato, per tutti gli endpoint analizzati, risposte che indicano che lo stress dovuto alla contaminazione delle acque è basso: i) la fecondità è risultata inferiore al controllo di laboratorio, ma il numero medio di neonati è superiore al valore minimo (N=60) accettabile per il gruppo di controllo secondo la OECD 211 Guideline (2012); ii) la percentuale di uova abortite e neonati non vitali (FD%), superiore rispetto al controllo di laboratorio, ha mostrato valori che possono essere riscontrati occasionalmente anche in assenza di contaminazione (Gorbi et al., 2011). Anche il dato di T1% indica una genotossicità bassa e trascurabile in base ai valori riportati da Pellegrini et al. (2014). Per quanto riguarda il profilo trascrizionale dei geni selezionati (Fig 2), è stata osservata la down-regolazione del solo gene cpa1 (FC=0,29), mentre vtg1, cut12 e dhb1 hanno mostrato un'attività trascrizionale non alterata. Questo significa che il cattivo stato qualitativo della sezione a monte dello scarico non sembra attribuibile a carichi tossici, genotossici e/o alla presenza di elevate concentrazioni di sostanze con attività pseudo-ormonale e che le cause sono da ricercare fra altri possibili fattori di stress quali carico di nutrienti e/o alterazioni idromorfologiche. Negli organismi esposti ai campioni prelevati nelle due stazioni a valle dello scarico, tutti gli end point analizzati, con la sola eccezione della età media alla riproduzione e della sopravvivenza nella stazione 3, indicano condizioni di stress elevato: fecondità ridotta e valori di FD% molto alti, valori di tail

intensity % superiori a 20, profilo trascrizionale alterato per tutti i geni analizzati. Nel loro insieme questi risultati indicano che, nelle sezioni a valle dell'effluente, il carico di xenobiotici tossici, genotossici e la presenza di sostanze con attività pseudo-ormonale costituiscono sicuramente un fattore che incide pesantemente sullo stato qualitativo del corpo idrico.

*Tabella 1: Risultati del test cronico (21 gg; media± deviazione standard) con Daphnia magna e del Comet Assay effettuato su dafnidi esposti in vivo ai campioni di acqua prelevati nelle stazioni (1, 2 e 3) localizzate sul Canale Naviglio Navigabile. C = controllo di laboratorio. EBI = Extended Biotic Index. FD% = Failed Development % (vedi testo). TI% = Tail Intensity %. Lettere diverse contrassegnano valori significativamente diversi per ciascun endpoint (ANOVA e test di Tukey,  $p < 0,001$  per il numero di neonati per femmina sopravvissuta fino al 21° giorno; test di Mann Whitney,  $p < 0,01$  per FD%).*

Stazione	ENDPOINT					EBI
	Sopravvivenza (%)	Età media alla riproduzione (giorni)	Numero medio di neonati	FD%	TI%	
C	100	6,2±0,33	115,3±19,8 <sup>a</sup>	1,93±1,39 <sup>a</sup>	7,4±2,4	
1	100	5,8±0,6	66,0±16.7 <sup>b</sup>	6,54±4,60 <sup>b</sup>	11,1	2
2	70	6,5±1,3	21,7±5,7 <sup>c</sup>	48,9±12,8 <sup>c</sup>	27,9	2
3	90	5,6±0,7	33,3±10.0 <sup>c</sup>	26,7±18,0 <sup>d</sup>	21,6	2



*Figura 2: Profilo trascrizionale dei geni vitellogenina 1 (vtg1), cuticola 12 (cut12), carbossipeptidasi A1 (cpa1) ed emoglobina 1 (dhb1) in dafnidi esposti per 48 h ai campioni di acqua prelevati nelle tre sezioni del corpo idrico. Le linee tratteggiate corrispondono ai valori di fold change 2 e 0,5.*

## *Conclusioni*

I saggi e gli endpoint utilizzati hanno mostrato di rispondere in modo coerente fra loro e poter discriminare situazioni diversificate. Nel loro complesso possono quindi costituire utili strumenti diagnostici nel monitoraggio investigativo degli ambienti acquatici, in grado di fornire indicazioni sulle possibili pressioni alla base di non buone condizioni ecologiche.

## *Bibliografia*

- Altenburger R, Nendza M, Schuurmann G 2003. Mixture Toxicity and Its Modeling By Quantitative Structure-Activity Relationships. *Environ Toxicol Chem* 22: 1900-1915.
- APAT IRSA-CNR, 2003. Manuali e linee guida 29/2003 - Serie 8000 - Metodi Ecotossicologici.
- ARPA (PR), 2014. Report sullo stato delle acque superficiali in Provincia di Parma (triennio 2010-2012).
- Brooks BW, Riley TM, Taylor RD 2006. Water quality of effluent-dominated ecosystems: ecotoxicological, hydrological, and management considerations. *Hydrobiologia* 556: 365-379.
- De Zwart D, Posthuma L, Gevrey M, von der Ohe PC, de Deckere E 2009. Diagnosis of ecosystem impairment in a multiple-stress context—how to formulate effective river basin management plans. *Integr Environ Assess Manag* 5: 38-49.
- Gorbi G, Moroni F, Sei S, Rossi V 2011. Anticipatory metrnal effects in two different clones of *Daphnia magna* in response to food shortage. *J Limnol* 70: 222-230.
- Martinez-Haro M, Beiras R, Bellas J, Capela R, Coelho JP, Lopes I, Moreira-Santos M, Reis-Henriques AM, Ribeiro R, Santos MM, Marques JC, 2015. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecol Indic* 48: 8-16.
- OECD, 2012. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.
- Pellegrini V, Gorbi G, Buschini A 2014. Comet Assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing. *Aquat Toxicol* 155: 261-268.
- Suter GW II, Norton SB, Cormier SM 2002. A methodology for inferring the causes of observed impairments in aquatic ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 21: 1101-1111.
- Wernersson AS, Carere M, Maggi C, Tusil P, Soldan P, James A, Sanchez W, Dulio V, Broeg K, Reifferscheid G, Buchinger S, Maas H, Van Der Grinten E, O'Toole S, Ausili A, Manfra L, Marziali L, Polesello S, Lacchetti I, Mancini L, Lilja K, Linderoth M, Lundeberg T, Fjällborg B, Porsbring T, Larsson DJ, Bengtsson-Palme J, Förlin L, Kienle C, Kunz P, Vermeirssen E, Werner I, Robinson CD, Lyons B, Katsiadaki I, Whalley C, den Haan K, Messiaen M, Clayton H, Lettieri T, Carvalho RN, Gawlik BM, Hollert H, Di Paolo C, Brack W, Kammann U, Kase R 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ Sci Eur* 27: 1-11.
- Wollenberger L, Halling-Sørensen B, Kusk KO 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 40, 723-30.

# PERSONAL CARE PRODUCTS AND MICROPLASTICS CONTAMINATION IN AQUATIC ENVIRONMENTS: PRELIMINARY RESULTS OF A SURVEY ON EXFOLIANTS

by C. Guerranti<sup>a</sup>, M. Renzi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Bioscience Research Center, Via Aurelia Vecchia 32, 58015, Orbetello (GR) Italy - cristiana.guerranti@bsrc.it, monia.renzi@bsrc.it

---

This study, whose preliminary results are presented here, starts from a market survey, aimed at making a statistic about the presence of microplastics in personal care products. The products, identified as a result of the market investigation were divided into price ranges; from each of these products containing microplastics have been selected. The analysis of the microplastic contained in them has been carried out, estimating quantities, colour and size class. A first assessment the total load of microplastics released in the environment at every usage, for each product analyzed, was carried out. The microplastic recovered were then treated and administered to *Daphnia magna* and *Corophium orientalis* to assess the possible effects related to the ingestion of the microparticles.

Keywords: microplastics, personal care products, environmental loads, plastic litter, plastic beads

## Introduction

Cosmetics and personal care (scrub, shower gel, toothpaste) may contain plastic microbeads. The plastic particles are added to the products to make a mechanical exfoliation on skin or, in the case of toothpaste, the dental enamel surface. Being too small to be retained by water purification systems, these microplastics end up in aquatic systems and are exchanged and taken as food by organisms, which, in this way, are contaminated.

Some countries, including the USA, have banned the use of microspheres in personal care products, by the 2017. In other countries such as Taiwan, UK, Australia and Canada are questioned regulations ban its use. In the EU, the major cosmetic companies have committed themselves to eliminate voluntarily microplastic from their products by 2021 (Cheung and Fok, 2016).

The aim of this study is to provide indications about the commercial diffusion of products currently containing microplastic, estimate the release into the environment with the use of such products and to investigate the possibility by some micro aquatic invertebrates to interact and/or ingest the plastic particles deriving from these products.

### ***Materials and methods***

In June 2016, in the municipality of Siena were surveyed 224 commercial exercises (pharmacies, beauty shops, herbalist shops, tobacco shops, grocery stores, supermarkets etc) that sell personal care products. Of these, 147 selling at least a product containing plastic (polyethylene microbeads, in most cases) for a total of 18. On 12 of these, representative of the different price ranges (<10 euros, 10.1-20 euros, 20.1- 30, euros > 30.1 euros) were conducted extraction, classification and counting of microplastic and observations on the interaction microscopy of aquatic invertebrates with the plastic particles.

Analyses were performed by Bioscience Research Center. An amount equal to about one gram of product (3 replicates for each sample) was collected from each commercial package; the exact weight was noted and then the sample was subjected to treatment for extraction of polyethylene microbeads, following the method proposed by Chang (2015), with some modifications. The samples of products were placed on a 64 micron sieve and washed under running water in order to remove the entire component diverse from plastic beads. Then the microbeads were recovered with a spatula, using deionized water from a squirt bottle to loosen it from the sieve and transferred in a filtrating system, consisting in filtration glass set, filter paper fibres (0.45 micron filter disks), vacuum pump, manifold and funnel. Glassware was accurately rinsed to increase recovery efficiency of litter. Filters were stored in glass Petri dish and dried in oven at 35 °C overnight. Each filter was dried separately to avoid contamination. The plastic items were collected by stereomicroscopy (Nikon SMZ-800 N) with micro tweezers and stored in Eppendorf tubes filled with distilled water. All identified items were divided in dimensional classes. The Nikon's software for the imaging analysis was applied to the microbeads dimensional measurements (Nikon ACT-1). All the filters were checked by the four-eye approach and by an inter-calibration process performed between two operators; in order to minimise accidental contaminations, only glass materials and cotton dresses were used by operators and to treat samples and tests were performed on blanks. Filters (n= 3) were left overnight exposed to the laboratory air, putting them on the desk on an opened glass Petri dish. After that, filters were extracted as tissue samples and checked by the four-eye approach to detect microplastics. All blanks analysed resulted free from microplastics. The microplastic extracted from cosmetic products, washed in water until no longer had perceptible odour and dried in a vacuum hood, have been administered to *Corophium orientalis* and *Daphnia magna* to evaluate litter uptakes by species. Observations were performed by stereomicroscopy (Nikon SMZ-800 N) after 24 and 48 h of exposure to microplastics.

### ***Results and discussion***

The results on the presence of microplastics in the products analyzed are shown in detail in Figure 1 and Figure 2 (medians of 3 replicates). Microplastics concentrations ranged 482 to 15,058 items/g product

(median 8,966) and 2.2% to 26.6% was the range of percentage of plastics on total sample weight (median 7.8).

The microplastics (micro beads and fragments of microbeads agglomerated together) had a diameter included between 0.5 and 2.0 mm.

Considering an average product use of 10 g for each treatment, 0.22 to 2.67 g of microplastic is introduced in the domestic sewage (from 4,820 to 150,580 in terms of individual particles). According to the instructions on the label, it can be expected once/twice a week use for all products (scrubs) except for n. 9 (shower gel) for which a daily use can be assumed.

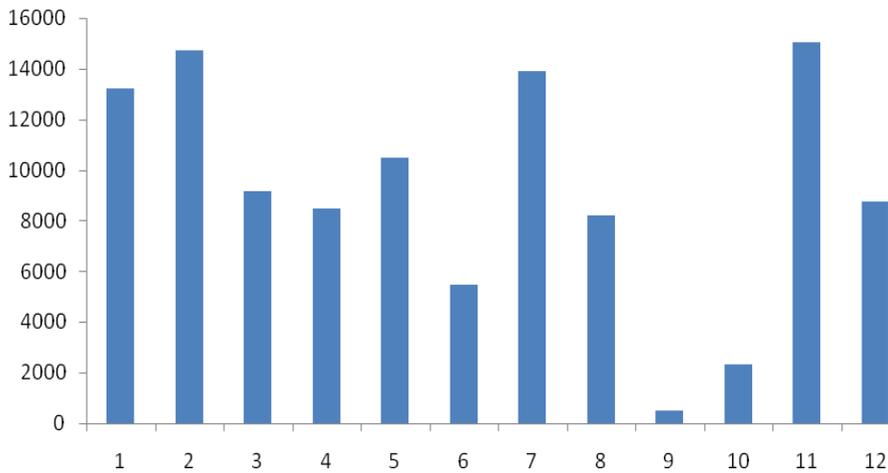


Figure 1: Number of microplastic items/g product

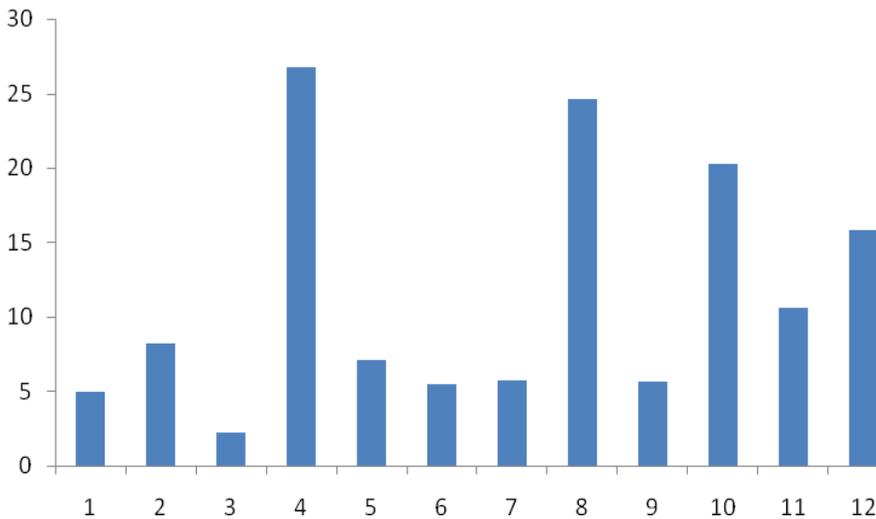


Figure 2: Microplastic percentage on the whole product on a weight basis

*Daphnia magna* and *Corophium orientalis* showed interaction with microbeads after 24 and 48 h, but the ingestion has not been documented in this study, probably due to the absence of preconditioning of microparticles.

Ingestion of microplastic is documented in the literature for different species zooplankton and mussels (e.g. Cole et al., 2013; EFSA, 2016) with important implications for the health of marine organisms, food chains and also human health. However, despite the large quantities of microbeads that it was assumed coming from the use of personal care products, this type of microplastics has never been found in sediments from numerous marine and river environments, Italians and Croats, that we have analyzed (Fastelli et al., 2016; Blaskovich et al., 2017; Guerranti et al., 2017; Cannas et al., in press). This is probably due to the fact that the polyethylene microbeads tend to float, remaining on the water surface, and exposing, then, to their accidental consumption, only organisms that feed on the surface.

#### ***Conclusive remarks and future research***

The preliminary data showed a large impact in terms of environmental microplastics input, through the use of products for personal care products containing polyethylene microbeads, supporting the opportunity to cease the use of such products.

Further experiments are in progress on *A. salina*, and *M. galloprovincialis*, exposed to the contact with the same microplastics crushed in a mortar and put up for three months in natural sea water enriched with algal specie to perform preconditioning. Experiments will give information to ascertain the influence of factors, such as size, heaviness of microplastic and possibility to be covered on the surface by microalgae, on the assumption as feeding resource by such organisms.

#### ***Acknowledgments***

Dr. Paolo Fastelli, Dr. Susanna Cannas and Ms. Serena Anselmi deserve many thanks for their collaboration on this study.

#### ***References***

- Blašković, A., Fastelli, P., Čižmek, H., Guerranti, C., & Renzi, M. (2017). Plastic litter in sediments from the Croatian marine protected area of the natural park of Telašćica bay (Adriatic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 114, 583-586.
- Cannas, S., Fastelli, P., Guerranti, C., & Renzi, M. (In press). Plastic litter in sediments from the coasts of south Tuscany (Tyrrhenian Sea). *Marine Pollution Bulletin*
- Chang, M. (2015). Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. *Marine Pollution Bulletin*, 101, 330-333

Cheung, F. (2016). Evidence of microbeads from personal care product contaminating the sea. *Marine Pollution Bulletin*, 109, 582–585

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T.S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 2588-2597.

EFSA CONTAM Panel (2016). Statement on the presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*;14(6) 4501

Fastelli, P., Blasković, A., Bernardi, G., Romeo, T., Čížmek, H., Andaloro, F., Russo, G.F., Guerranti, C., Renzi, M. (2016). Plastic litter in sediments from a marine area likely to become protected (Aeolian Archipelago's islands, Tyrrhenian sea). *Marine Pollution Bulletin*, 113, 526-529.

Guerranti, C., Cannas, S., Scopetani, C., Fastelli, P., Cincinelli, A., & Renzi, M. (2017). Plastic litter in aquatic environments of Maremma Regional Park (Tyrrhenian Sea, Italy): Contribution by the Ombrone river and levels in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 117, 366-370.

Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C.R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65-70.

# IL RUOLO DELL' ECOTOSSICOLOGIA NELL'ALLEGATO TECNICO AL DM 173/2016

by *D. Pellegrini*<sup>a</sup>, *F. Onorati*<sup>b</sup>, *C. Mugnai*<sup>b</sup>

<sup>a</sup> ISPRA - STS Livorno, david.pellegrini@isprambiente.it

<sup>b</sup> ISPRA - Roma, fulvio.onorati@isprambiente.it,  
cristian.mugnai@isprambiente.it

---

**Abstract** -. L'allegato tecnico al DM n 173/2016 stabilisce le modalità e i criteri per la caratterizzazione, la classificazione e l'individuazione delle possibili opzioni di gestione dei sedimenti marini e salmastri da sottoporre a movimentazione. I sedimenti, prima del dragaggio, devono essere assoggettati a un procedimento di caratterizzazione fisica, chimica ed ecotossicologica, a seguito del quale dovrà essere predisposto un piano di gestione che preveda le diverse destinazioni dei materiali in funzione della loro qualità (classi A – E). In questo contesto, i saggi biologici acquistano un ruolo predomnicante essendo eseguiti prima delle analisi chimiche e su tutti i campioni di sedimento. Inoltre i risultati delle analisi ecotossicologiche vengono valutati nel loro insieme a livello di "batteria" (non di singolo saggio), pesando la rilevanza biologica degli effetti misurati, la significatività statistica del risultato, la rilevanza ecologica della matrice testata, nonché la tipologia di esposizione. Vengono altresì introdotti come obbligatori saggi di tipo cronico (generalmente molto più sensibili).

Keywords: sedimenti, saggi biologici, batteria, classificazione, approccio integrato

## *Introduzione*

Il D.M. n. 173/2016, entrato in vigore il 21 settembre 2016, stabilisce modalità e criteri tecnici per il rilascio dell'autorizzazione all'immersione in mare di materiali di escavo di fondali marini o salmastri o di terreni litoranei.

L'Allegato tecnico al decreto è scaturito da una proposta tecnica frutto dell'attività istituzionale e tecnico-scientifica condotta da ISPRA, CNR e ISS, con la collaborazione di CoNiSMA, che ha consentito di trasferire sul piano normativo alcune novità che avranno importanti risvolti sulla gestione ambientale sostenibile. E' intenzione degli enti tecnici proseguire tale attività istituzionale anche attraverso l'organizzazione di momenti di informazione/formazione e di approfondimento nei riguardi del personale del SNPA e delle Regioni per una piena e immediata applicabilità del D.M., includendo anche l'utilizzo dei tool informatici di elaborazione dati appositamente sviluppati e resi disponibili.

Dal punto di vista tecnico-scientifico, si parte dall'assunto, ormai ampiamente condiviso a livello internazionale, di considerare il materiale prodotto dell'escavo una "risorsa" da recuperare e riutilizzare. Il sedimento marino, una volta che si decida di sottoporlo a escavo deve essere però assoggettato a un procedimento di caratterizzazione fisica, chimica ed ecotossicologica, a seguito del quale dovrà essere predisposto un apposito progetto di gestione che preveda le diverse destinazioni dei materiali in funzione della loro qualità (classi A – E) sulla base di criteri prestabiliti. La individuazione della qualità dei sedimenti infatti prevede un profondo cambiamento: da un approccio "pass to fail" o "tabellare" in cui la classificazione chimica viene determinata dal superamento, anche lieve e per un sola sostanza, di un livello chimico di riferimento e la classificazione ecotossicologica viene basata sul risultato peggiore ottenuto da una batteria di almeno 3 saggi biologici, si passa a criteri di integrazione ponderata in cui vengono considerati il numero dei contaminanti che superano il livello chimico di riferimento, l'entità di tali sforamenti e la tipologia dei contaminanti (sostanze prioritarie o pericolose prioritarie ai sensi del D.lgs 172/2015). Analogamente, i risultati delle analisi ecotossicologiche, che assumono un ruolo prioritario, essendo eseguite prima delle analisi chimiche, vengono valutati nel loro insieme a livello di "batteria" (non di singolo saggio), pesando la rilevanza biologica degli effetti misurati, la significatività statistica del risultato, la rilevanza ecologica della matrice testata, nonché la tipologia di esposizione (Benedetti et al 2011; Piva et al 2011). Vengono altresì introdotti per la prima volta, rispetto al manuale APAT-ICRAM (2007), saggi di tipo cronico (generalmente molto più sensibili).

L'intero set di dati chimico-fisici ed ecotossicologici viene elaborato tramite un tool informatico sviluppato da ISPRA con la collaborazione dell'Università Politecnica delle Marche (Sediquasoft 109.0®).

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

I saggi biologici devono essere eseguiti su tutti i campioni destinati alle analisi, singoli o accorpati. I risultati devono essere riportati su rapporti di prova rilasciati dai laboratori, indicando, oltre ai dati grezzi, il metodo ed i parametri statistici necessari, a supporto della affidabilità del dato.

In particolare i risultati devono essere espressi come effetto misurato nel campione ( $\pm$  scarto tipo  $\sigma$ ) e nel controllo negativo ( $\pm$  scarto tipo  $\sigma$ ), riferito alla massima concentrazione del campione testata (compatibilmente al metodo del saggio impiegato);

Salvo specifiche indicazioni del metodo adottato, il sedimento intero o la frazione solida del sedimento deve essere saggiata a fresco (non congelata, non essiccata né liofilizzata) prima possibile e comunque non oltre 15 giorni di conservazione a 4 – 6 °C al buio; la frazione liquida (acqua interstiziale o elutriato 1:4 p/v) deve essere preparata entro 10 giorni dal sedimento tal quale conservato a 4°C al buio e, se non saggiata

entro le 24 h dalla preparazione, conservata a -20°C fino al momento dell'analisi.

La batteria di minima deve essere composta da almeno 3 organismi appartenenti a gruppi tassonomici ben distinti, scegliendo una delle combinazioni di cui alla Tabella 1 per ciascuna delle tipologie deve essere selezionato un saggio biologico a scelta tra quelli indicati con il segno "X". La combinazione deve essere la stessa per la totalità dei campioni previsti nell'ambito della medesima istruttoria.

A titolo esemplificativo una combinazione è la seguente:

1a tipologia: saggio sulla fase solida. Bioluminescenza con *Vibrio fischeri* su sedimento privato dell'acqua interstiziale;

2a tipologia: saggio su fase liquida. Inibizione di crescita algale con *Pheodactylum tricornutum* o *Dunaliella tertiolecta* o *Skeletonema costatum* su elutriato;

3a tipologia: saggio con effetti cronici/sub-letali/a lungo termine e di comprovata sensibilità. Embriotossicità con *Paracentotus lividus*, *Mytilus galloprovincialis* o *Crassostrea gigas* su elutriato.

Completata la fase di campionamento e analisi, sulla base delle risultanze ottenute si procede con la classificazione ecotossicologica di ciascun campione di sedimento basata sull'utilizzo dei criteri di integrazione ponderata.

Tabella 1 – Saggi biologici utili per l'allestimento della batteria. (XA saggio acuto, XC cronico, sub letale)

Gruppo	Batteri		Alghe	Crostacei					Molluschi Bivalvi		Echinodermi		
<b>Specie</b>	<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Pheodactylum tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i>	<i>A. amphitrite</i>	<i>Corophium</i> spp	<i>Acartia tonsa</i>		<i>Tigriopus fulvus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Paracentrotus lividus</i>		
<b>Matrice</b>	fase liquida	fase solida	fase liquida	fase liquida	Sed. intero	fase liquida		Sed. intero	fase liquida	fase liquida	fase liquida	fase liquida	
<b>Endpoint</b>	Bioluminescenza		Crescita algale	Mortalità	Mortalità	Mort (48 h)	Mort (7 gg)	Svil larv.	Mortalità	Sviluppo larvale	Sviluppo larvale	Fecondazione	Sviluppo larvale
<b>1ª tipologia</b>		XA			XA			XC					
<b>2ª tipologia</b>	XA		XC	XA		XA			XA			XA	
<b>3ª tipologia</b>							XC			XC	XC		XC

### ***Criteria di integrazione ponderata per la valutazione delle risultanze ecotossicologiche***

I criteri di integrazione ponderata considerano aspetti importanti e caratteristiche specifiche dei saggi biologici inclusi nella batteria utilizzata, tra cui la significatività statistica della differenza di effetto tra campione e controllo (contemplando la variabilità tra le repliche, sia nel controllo, sia nel campione); la severità dell'effetto (inteso come gravità del danno biologico misurato dallo specifico end-point); la tipologia di esposizione (acuta o a breve termine, cronica o a lungo termine); la rappresentatività ambientale della matrice testata.

Per ciascuno dei saggi previsti nelle diverse tipologie di batterie utilizzabili è indicata una "soglia" di effetto che rappresenta la variazione minima ritenuta biologicamente significativa per ciascuna condizione sperimentale (Tabella 2).

*Tabella 2 – Valori di soglia attribuiti ai saggi biologici previsti nelle batterie.*

<b>Specie</b>	<b>Endpoint (E)</b>	<b>Soglia (%)</b>	<b>Esposizione (T)</b>	<b>Matrice (M)</b>
<i>Acartia tonsa</i>	Sviluppo larvale	20	Cronica/sub.let	a, d
	Mortalità	15	Acuta	b, c
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	Mortalità	10	Acuta	b, c
<i>Corophium insidiosum</i>	Mortalità	15	Acuta	a, d
<i>Corophium orientale</i>	Mortalità	15	Acuta	a, d
<i>Crassostrea gigas</i>	Sviluppo	15	Cronica sub let.	c
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Crescita algale	10	Cronica sub let.	b, c
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Sviluppo	15	Cronica sub let.	b, c
<i>Paracentrotus lividus</i>	fecondazione	15	Acuta	b, c
	Sviluppo	15	Cronica	b, c
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Crescita algale	10	Cronica	b, c
<i>Skeletonema costatum</i>	Crescita algale	10	Cronica	b, c
<i>Tigriopus fulvus</i>	Mortalità	10	Acuta	b, c
<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	15	Acuta	b, c
		25		a, d

a = sedimento intero; b = acqua interstiziale; c = elutriato; d = sedimento umido (privato di acqua interstiziale); e = acqua della colonna.

Vengono anche riportati i “pesi” attribuiti a ciascun saggio in funzione della rilevanza biologica dell'end-point misurato, della durata dell'esposizione, della matrice testata (Tabella 3).

*Tabella 3 – Pesi attribuiti in funzione della rilevanza dell'endpoint biologico, la matrice, il tempo di esposizione ed utilizzati per il calcolo del coefficiente  $W_2$ . Vengono riportati anche i valori per la biostimolazione algale.*

ENDPOINT BIOLOGICO	(En)	MATRICE	(M)
fecondazione	1.5	Sedimento intero (tal quale)	1
Sviluppo	1.9	Acqua interstiziale	0.8
Crescita algale	2.1	Elutriato	0.7
Bioluminescenza	2.4	Sedimento umido (es. centrifugato)	0.6
Sopravvivenza	3		
<b>ESPOSIZIONE</b>	<b>(T)</b>	<b>BIOSTIMOLAZIONE</b>	<b>Ei</b>
Acuta	1	$E \leq 40\%$	0
Cronica	0,7	$40 < E \leq 100\%$	1.25
		$E > 100\%$	1.5

Vengono di seguito descritti i passaggi e le procedure di calcolo per l'integrazione dei risultati e la formulazione del giudizio di tossicità di cui è riportato uno schema complessivo in Figura 1:

- dopo la verifica dei dati, per ciascun saggio biologico viene calcolato l'effetto (E), inteso come variazione percentuale dell'endpoint misurato e compensato tramite la correzione di Abbott rispetto alle variazioni osservate nel controllo (eq. 2 del flow-chart di Figura 1);
- l'effetto  $E_i$  viene corretto in base alla significatività statistica della variazione rispetto ai controlli, applicando il coefficiente Z che viene calcolato in funzione del valore ottenuto dal test T per dati con varianza disomogenea (punto 3 del flow-chart di Figura 1). Il coefficiente Z ha un valore pari a 1 (nessuna riduzione dell'effetto) quando il campione risulta significativamente diverso dal controllo ( $p < 0.05$ ); esso decresce con il diminuire della significatività, passando in maniera lineare da 1 a 0.5 quando p cresce da 0.05 a 0.06. Per valori di p superiori a 0.06, il coefficiente Z diminuisce rapidamente in maniera non lineare fino a 0.2, quando p tende a 1. Questa correzione riduce progressivamente il peso complessivo di un saggio non statisticamente significativo, ma non ne elimina completamente il contributo alla batteria;

- ciascun effetto ( $E_i$ ) moltiplicato per il suo coefficiente  $Z$ , viene rapportato con la “soglia” specifica per quel saggio (eq. 4 del flow-chart di figura 1); l'effetto corretto ( $E_{iw}$ ) così ottenuto indica di quante volte la variazione misurata in un saggio supera quella ritenuta biologicamente rilevante;
- solo per i saggi algali, in caso di un effetto di biostimolazione, viene assegnato un valore di  $E_{iw}$  pari a 0 se l'effetto è < 40%, 1.25 se l'effetto è > 40% ma < 100%, pari a 1.5 se l'effetto è > 100%;
- l'indice di pericolo complessivo della batteria di saggi ecotossicologici (Hazard Quotient,  $HQ_{Batteria}$ ) viene calcolato come sommatoria degli effetti pesati ( $E_{iw}$ ) dei singoli saggi (eq. 5 del flow-chart di figura 1), ulteriormente corretti secondo il fattore  $W_2$  che corrisponde al prodotto dei pesi assegnati in funzione della rilevanza biologica dell'endpoint considerato, della rilevanza ecologica della matrice testata, della esposizione acuta o cronica degli organismi (Tabella 3).
- per l'attribuzione del livello di pericolo derivante dalla batteria di saggi ecotossicologici, il valore ottenuto per l'indice  $HQ_{Batteria}$  è normalizzato ad una scala compresa tra 0 e 10 (eq. 6 del flow-chart di figura 1), dove 1 corrisponde al valore di soglia della batteria (cioè il valore di  $HQ$  che si otterrebbe se tutti i saggi della batteria mostrassero un effetto pari alla rispettiva soglia) e 10 corrisponde al valore massimo della batteria (quando tutti i saggi mostrano il 100% di effetto). A seconda del valore dell' $HQ_{Batteria}$  normalizzato, il livello di pericolo ecotossicologico viene attribuito ad una classe di gravità (da assente a molto alto), identificata da un diverso colore: Assente/bianco se < 1; Basso/azzurro se  $HQ_{Batteria} \geq 1$  e < 1.5; Medio/giallo se  $HQ_{Batteria} \geq 1.5$  e < 3; Alto/rosso se  $HQ_{Batteria} \geq 3$  e < 6; Molto Alto/nero se  $HQ_{Batteria} \geq 6$  (Tabella 4).

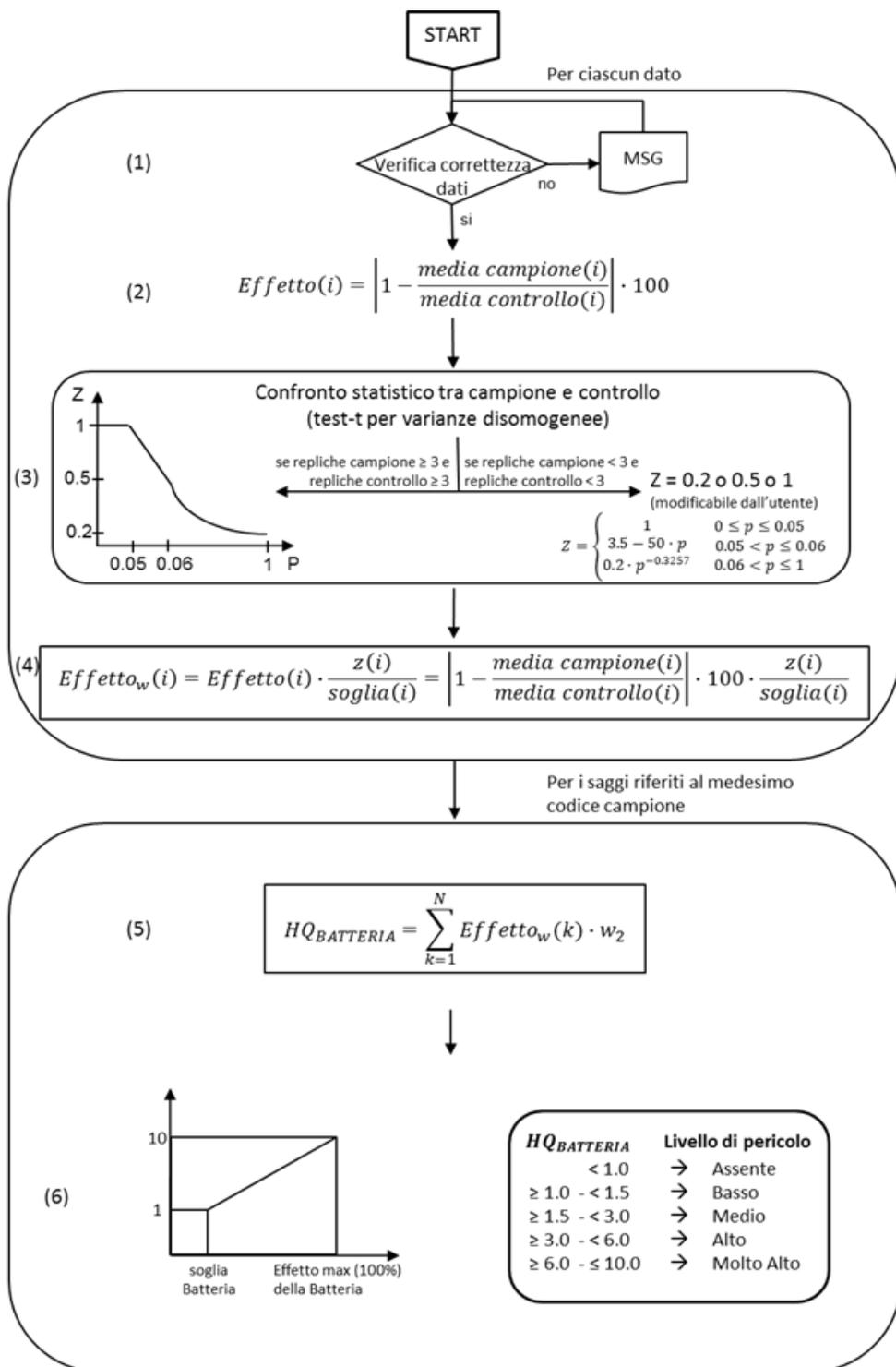


Figura 1 – Procedura per l'elaborazione dei dati dei saggi ecotossicologici.

*Tabella 4 – Classi di pericolo ecotossicologico rispetto ai valori di HQ (Hazard Quotient) della batteria di saggi.*

HQ BATTERIA DI SAGGI	CLASSE DI PERICOLO
< 1	Assente
≥1 - 1.5	Basso
≥ 1.5 - 3.0	Medio
≥ 3.0 - 6.0	Alto
≥6.0 - 10.0	Molto alto

### ***Bibliografia***

APAT-ICRAM, 2007 Manuale per la movimentazione di sedimenti marini. pp. 1-72. <http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/manuali-e-linee-guida/manuale-per-la-movimentazione-di-sedimenti-marini>

Benedetti, M., Ciaprini, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F., 2011 A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. Environ. Int. 38(1): 17-28

Piva F., Ciaprini F., Onorati F., Benedetti M., Fattorini D., Ausili A., Regoli F., 2011 Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. Chemosphere. 83: 475-485.



CON IL CONTRIBUTO DI:



CON IL SUPPORTO DI:

