



# *I SAGGI ECOTOSSICOLOGICI PER LA VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DELLE ACQUE E DEI SEDIMENTI*

---

Corso:  
LE ACQUE SUPERFICIALI, I SEDIMENTI IL BIOTA.  
Istituto Superiore di Sanità  
1-5 dicembre 2003

# *saggi ecotossicologici*

---

- prove che utilizzano un sistema biologico come bersaglio: un organismo vivente è posto a contatto per un determinato periodo con una sostanza in esame per osservarne la risposta
  - possono essere distinti in saggi acuti e cronici.
-

# *Saggi acuti e cronici*

---

- L'effetto tossico **acuto** si evidenzia in un periodo di tempo breve e, comunque, inferiore al tempo di generazione dell'organismo in esame
  - L'effetto tossico cronico si sviluppa, viceversa, in un periodo di tempo più elevato, può coinvolgere più generazioni di individui esposti e produce generalmente risposte che non compromettono la sopravvivenza degli organismi
-

# *Vantaggi dei saggi biologici*

---

- Rispondono a tutte le sostanze conosciute e non
  - Tengono conto della biodisponibilità
  - Integrano gli effetti di tutti i fattori biotici ed abiotici
  - Tengono conto della proprietà delle sostanze di bioaccumularsi
-

# *L'organismo ideale*

---

- Rilevante dal punto di vista ecologico o economico
  - Sensibile ad un numero elevato di contaminanti
  - Facilmente allevabile e facilmente manipolabile in laboratorio
  - facilmente identificabile
  - Indigeno
  - Tollerante ad un ampio range di condizioni fisico-chimiche (granulometrica del substrato, temperatura, salinità etc.)
-

# D. Igsl.152/99: acque superficiali

---

*“...Analisi supplementari: non obbligatorie, da eseguire a giudizio dell'autorità che effettua il monitoraggio, per una analisi più approfondita delle cause di degrado del corpo idrico. A tal fine possono essere effettuati saggi biologici finalizzati alla evidenziazione di effetti a breve o lungo termine. Tra questi in via prioritaria si segnalano:*

- test di tossicità su campioni acquosi concentrati su *Daphnia magna*;*
  - test di mutagenicità e teratogenesi su campioni acquosi concentrati;*
  - test di crescita algale;*
  - test su campioni acquosi concentrati con batteri bioluminescenti;*
-

# Preconcentrazione dei campioni acquosi

---

- scelta della metodologia di isolamento dei soluti
  - scelta del rapporto di concentrazione (che condiziona il volume dei campioni da prelevare)
  - scelta del test
  - interpretazione dei risultati
-

# *Metodi di estrazione*

---

estrazione in fase solida (SPE):

- carbopack: carbone grafitizzato che trattiene sia composti organici polari che apolari
  - amberlite XAD-2: resina macroreticolare che assorbe composti organici polari e debolmente polari
  - C18 o C8 catene idrocarburiche legate a gel di silice che trattengono composti organici debolmente polari ed apolari
-



# D. Igsi.152/99: sedimenti

*...Qualora sia necessaria un'analisi più approfondita volta a evidenziare gli effetti tossici a breve o a lungo termine si potranno effettuare dei saggi biologici sui sedimenti. Gli approcci possibili sono molteplici e riconducibili a tre soluzioni fondamentali:*

- saggi su estratti di sedimento*
- saggi sul sedimento in toto*
- saggi su acqua interstiziale*

*Ogni soluzione offre informazioni peculiari e pertanto l'applicazione congiunta di più tipi di saggio spesso garantisce le informazioni volute. Possono essere utilizzati organismi acquatici e sia in saggi acuti che (sub)cronici. In via prioritaria si segnalano: *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus tentans* e *C. riparius*, *Selenastrum capricornutum* e batteri luminescenti...*

# *Problemi e metodi nel campionamento ed analisi dei sedimenti*

---

- **Campionamento**
  - **Sedimento di riferimento**
  - **Conservazione**
  - **Raccolta dell'acqua interstiziale**
  - **Preparazione dell'elutriato**
-

# *Principali svantaggi nell'uso di una benna*

---

- formazione di un'onda nell'impatto che provoca l'allontanamento dei sedimenti superficiali più fini
  - perdita del profilo del sedimento
  - scarsa capacità di penetrazione
  - perdita dei composti più solubili in acqua
-

# *Principali svantaggi nell'uso di una carotatore*

---

- non operano bene con i sedimenti sabbiosi per difficoltà di penetrazione
  - i piccoli carotatori possono disturbare il profilo del sedimento
-

# *Sedimento di riferimento*

---

- può essere definito come una matrice che possiede caratteristiche simili a quelle della matrice utilizzata per il test (carbonio organico, pH, percentuali di limo, sabbia e argilla, grado di idratazione etc.) ma assenza di contaminati.
-

# Conservazione

---

- La conservazione altera la composizione in **solfori acidi volatili** che complessano i metalli limitandone la biodisponibilità
  - Il congelamento sembra essere implicato nella perdita del **carbonio organico** solubile ed influenzare di conseguenza il comportamento dei contaminanti organici
-

# *Saggi di tossicità su sedimento*

---

- Saggio di tossicità a breve termine (7 gg.) con *Onchorynchus Mykiss*
  - Saggio di tossicità (7 gg.) con *Ceriodaphnia dubia*
  - Saggio di tossicità con chironomidi
-

# saggi ecotossicologici sugli scarichi idrici

- *...Il saggio di tossicità è obbligatorio. Oltre al saggio su Daphnia magna, possono essere eseguiti saggi di tossicità acuta su Ceriodaphnia dubia, Selenastrum capricornutum, batteri bioluminescenti o organismi quali Artemia salina, per scarichi di acqua salata o altri organismi tra quelli che saranno indicati dall'ANPA in appositi documenti tecnici predisposti al fine dell'aggiornamento delle metodiche di campionamento ed analisi. In caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il risultato peggiore. Il risultato positivo della prova di tossicità non determina l'applicazione diretta delle sanzioni ...determina altresì l'obbligo di approfondimento delle indagini analitiche, la ricerca delle cause di tossicità e la loro rimozione .*



# *saggi ecotossicologici sul suolo*

---

- Saggio di tossicità con *Daphnia magna*
  - Saggio di tossicità con *Vibrio fischeri*
  - Saggio di tossicità con Chironomidi
  - Saggio di tossicità con Collemboli
  - Saggio di inibizione dell'allungamento radicale
  - Saggio di tossicità con Anellidi (*Eisenia fetida*)
-

# Genotossicità

---

- *Panagrellus redivivus*
  - Mutatox
  - Prova dei micronuclei
  - Test di Ames
-

## **D. Igsl.152/99: sedimenti marini ed aree di transizione**

---

*... sono considerati addizionali ...opportuni saggi biologici a breve o lungo termine, su specie selezionate appartenenti a diversi gruppi tassonomici, privilegiando le specie autoctone o quelle per le quali esistano dei protocolli standardizzati.*

*...l'eventuale evidenziazione di situazione di tossicità per gli organismi testati e/o evidenze di bioaccumulo sugli stessi portano ad attribuire lo stato ambientale "Scadente" ...*

---

# ***Saggi di tossicità su matrici salate o salmastre***

---

- ***Saggio di tossicità con ricci di mare***
  - ***Saggio di tossicità con *Corophium orientale****
  - ***Saggio di tossicità con stadi giovanili di branzino (*Dicentrarchus labrax*)***
  - ***Saggio di tossicità algale con *Dunaliella tertiolecta****
  - ***Saggio di tossicità con batteri luminescenti (“*Vibrio fischeri*”)***
-

# ***Saggio di tossicità con *Vibrio fischeri****

---

- Nella valutazione ecotossicologica dell'ambiente marino il saggio con *V. fischeri* è considerato uno dei più affidabili per la sua standardizzazione, riproducibilità, semplicità di applicazione.
  - Il test è applicabile all'acqua della colonna, all'acqua interstiziale, all'elutriato, al sedimento.
  - Ciascuna di queste matrici è in grado di fornire diverse informazioni.
-

# *Acqua della colonna*

---

- Valuta gli effetti dei contaminanti idrosolubili
  - In ambiente marino aperto può non essere sufficiente la sensibilità del test per apprezzare effetti acuti, ma può essere utile in aree particolarmente contaminate come le aree portuali.
-

# *Acqua interstiziale*

---

- È un comparto in cui si distribuiscono i contaminati idrofili che possono essere rilasciati dal sedimento nella colonna d'acqua, di conseguenza la tossicità dei contaminanti idrofobici viene generalmente sottostimata.
  - Rappresenta la più comune via di esposizione e di accumulo dei contaminanti associati al sedimento da parte degli organismi bentonici.
  - La disponibilità di acqua interstiziale dipende dalla composizione granulometrica
-

# *Elutriato*

---

- Fornisce informazioni su tutte le sostanze estraibili con acqua attraverso agitazione meccanica
  - Si ritiene che possa “imitare” gli effetti della movimentazione dei fondali marini (dragaggi, ripascimenti etc.).
  - È meno sensibile, per effetto della diluizione, del saggio su acqua interstiziale
-



# *Sedimento*

---

- fornisce informazione su quei contaminanti complessati o idrofobici che restano adesi al sedimento (IPA, PCB, composti organoclorurati)
-

# *SEDIMENT TOXICITY INDEX*

$$Y = 0,28 + 3,49X$$

(X = % pelite  
Y = Tossicità Naturale Stimata).

$$\text{STI (sediment toxicity index)} = \text{TU} / \text{TU naturale}(Y)$$

# Elaborazione statistica dei dati tossicologici (1)

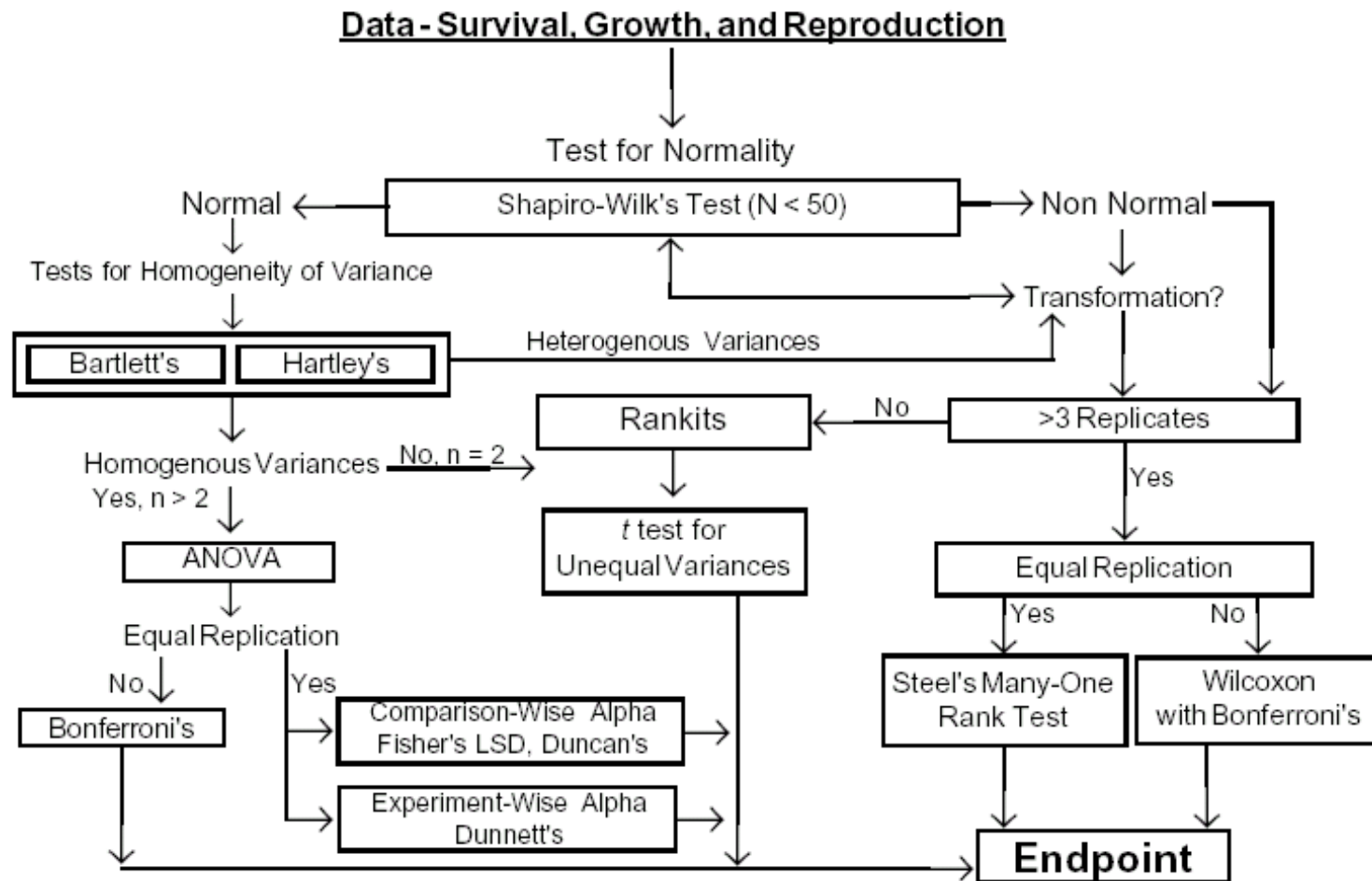
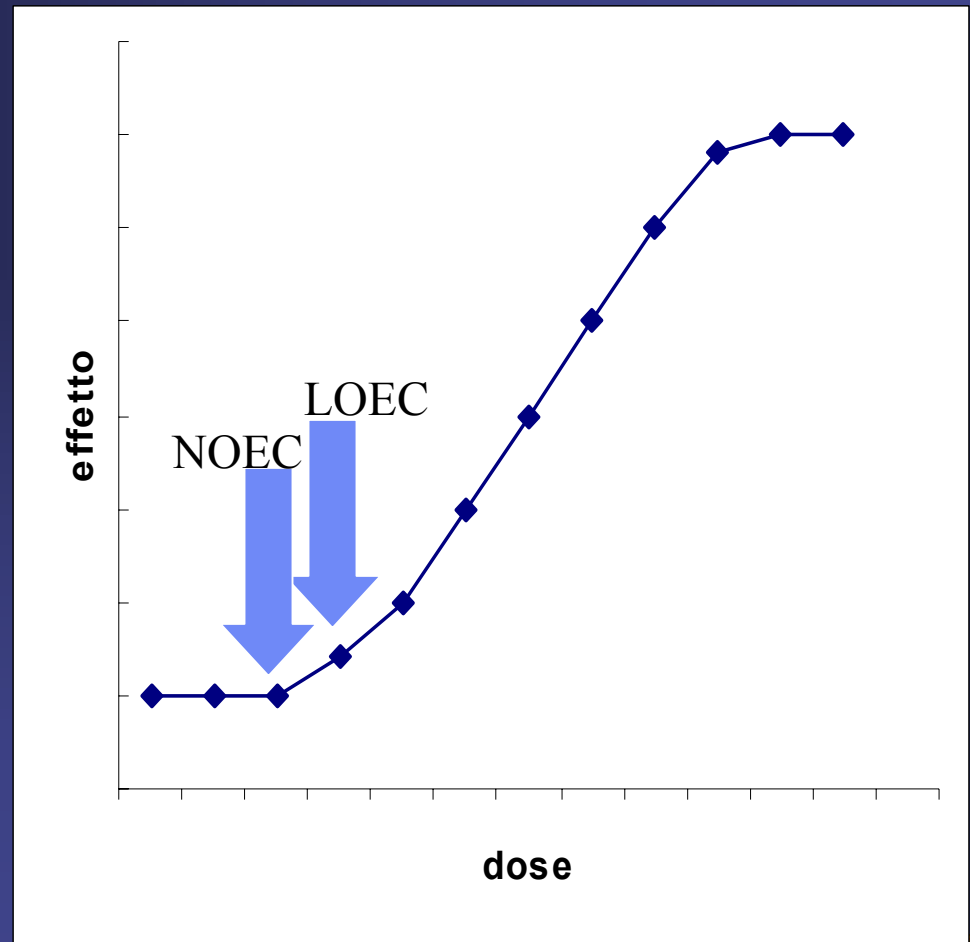


Figure 16.7 Decision tree for analysis of survival, growth, and reproduction data subjected to hypothesis testing.

# PARAMETRI SOGLIA: LOEC NOEC

- La LOEC è la concentrazione al disotto della quale non si osserva alcun effetto sull'End-Point prescelto
- La più alta concentrazione alla quale non si osservano effetti significativi si definisce NOEC



# *Limiti dei parametri soglia*

---

- I parametri soglia sono dipendenti dalle condizioni operative del test
  - Non si ha alcuna indicazione degli effetti nel campo compreso tra NOEC e NOEL: una più ravvicinata scansione delle diluizioni potrebbe fornire valori diversi
-

# Elaborazione statistica dei dati tossicologici (2)

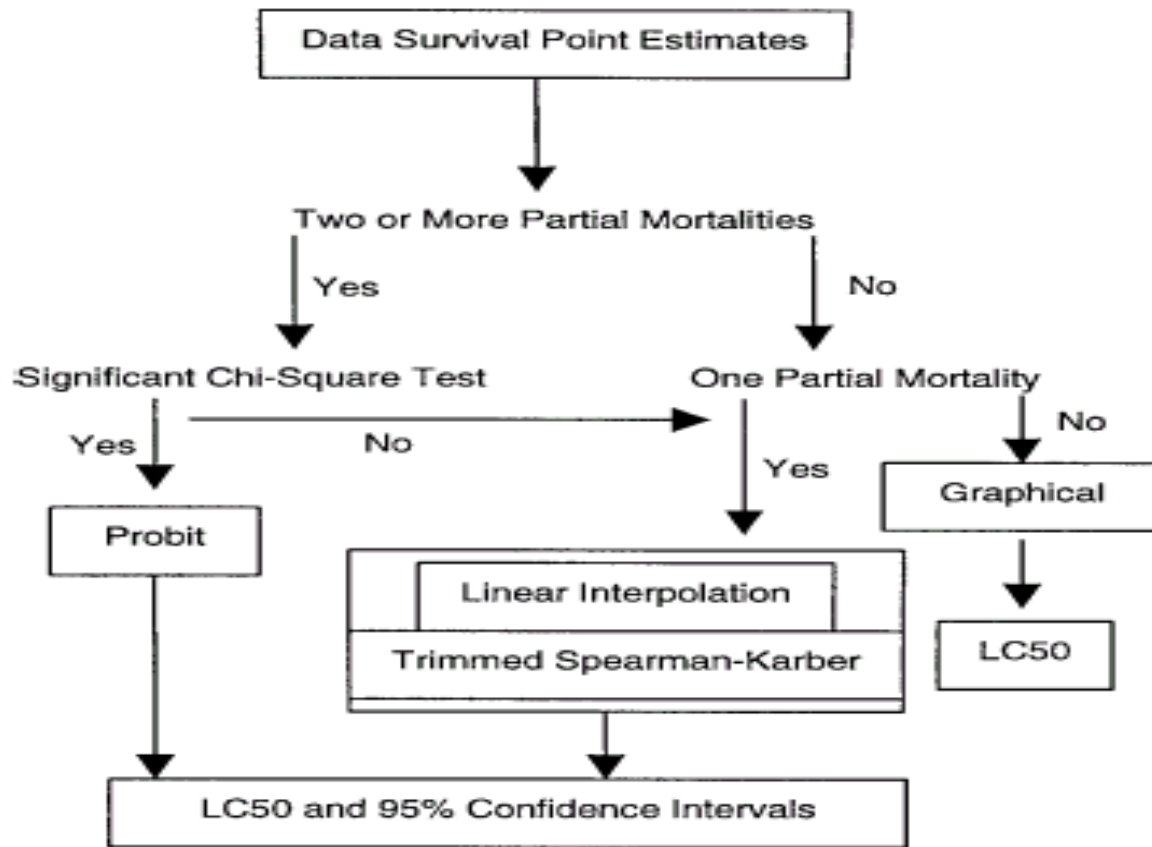


Figure 16.8 Decision tree for analysis of point estimate data.

# PARAMETRI MEDIANI

- $LD_{50}$  (dose letale mediana) : dose che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per somministrazione diretta. Viene di norma espressa per unità di peso corporeo dell'individuo
- $LC_{50}$  (concentrazione letale mediana) : concentrazione che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per esposizione ambientale. Si deve riferire al tempo di esposizione
- $EC_{50}$  (concentrazione efficace mediana): concentrazione che produce un effetto (diverso dalla morte) in organismi esposti in saggi acuti o cronici. Deve essere riferita al tempo di esposizione

# Modello probit

---

- Per stimare la relazione tra dose e risposta è necessaria una analisi di regressione. Non essendo però tale relazione lineare è necessario adottare un modello che linearizzi tale relazione.
  - Il metodo dei **probits** è un metodo di analisi delle curve sigmoidi dose-azione, una procedura statistica parametrica per stimare la LC50 (o EC50) e l'intervallo di confidenza associato. Il metodo consiste nel trasformare le proporzioni di effetto osservate in **probits** e le concentrazioni in **log**.
-



# Scale di tossicità (1)

Belgio TU (Toxicity Unit)		
<b>Estremamente tossico</b>	<b>&gt; 100</b>	
<b>Molto tossico</b>	<b>100</b>	<b>10</b>
<b>tossico</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>moderatamente tossico</b>	<b>&lt; 1</b>	
<b>Assenza di tossicità acuta</b>	<b>assenza</b>	

# Scale di tossicità (2)

Francia EC50 (% di campione)		
<b>Estremamente tossico</b>	<b>&lt; 0.1</b>	
<b>Molto tossico</b>	<b>0.1</b>	<b>1</b>
<b>tossico</b>	<b>1</b>	<b>10</b>
<b>moderatamente tossico</b>	<b>10</b>	<b>100</b>
<b>Assenza di tossicità acuta</b>	<b>&gt; 100</b>	

# Scale di tossicità (3)

ECOTOX (Oddo)		
<b>estremamente tossico</b>	<b>&lt;20</b>	
<b>discretamente tossico</b>	<b>20</b>	<b>50</b>
<b>debolmente tossico</b>	<b>50</b>	<b>80</b>
<b>tracce di tossicità</b>	<b>&gt;80</b>	

# *Scala di tossicità acuta per Vibrio fischeri (SPT)*

elutriato (riduzione bioluminescenza $\Delta$ %)	Fase solida	giudizio
<b>-10 &lt; <math>\Delta</math> &lt; 10</b>	<b>0 &lt; STI &lt; 1</b>	<b>Tossicità assente</b>
<b>10 &lt; <math>\Delta</math> &lt; 20</b>	<b>1 &lt; STI &lt; 3</b>	<b>Tossicità lieve</b>
<b>20 &lt; <math>\Delta</math> &lt; 40</b>	<b>3 &lt; STI &lt; 6</b>	<b>Tossicità media</b>
<b>40 &lt; <math>\Delta</math> &lt; 80</b>	<b>6 &lt; STI &lt; 12</b>	<b>Tossicità alta</b>
<b>80 &lt; <math>\Delta</math> &lt; 100</b>	<b>&gt; 12</b>	<b>Tossicità molto alta</b>