

IMPIEGO DI SAGGI MULTISPECIE NELLA CARATTERIZZAZIONE ECOTOSSICOLOGICA DI DIVERSE MATRICI ACQUOSE.

Pasini M.A., Marangoni E., Secondi A., Villa M.

ARPA Lombardia –Sede di Pavia- Via N. Bixio 13, 27100 Pavia- Tel 0382432623.

14° CONGRESSO INT.LE DEI BIOLOGI “SALUTE, SICUREZZA E QUALITA’: OBIETTIVI DI UNA PROFESSIONE” ALTAVILLA MILICIA (PA) 11/14 OTTOBRE 2001

RIASSUNTO

Per valutare la biodisponibilità degli inquinanti, fenomeni di sinergia e/o antagonismo, in alcune matrici acquose ambientali (acque di superficie, di scarico, di pozzi piezometrici e interstiziali di sedimenti) è stata utilizzata una batteria di test acuti e cronici che impiega organismi appartenenti a diversi livelli trofici (*Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Selenastrum capricornutum*, *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*, e *Cucumis sativus*).

I dati si riferiscono all'attività svolta nel primo semestre 2001.

Su tutti i campioni sono stati osservati effetti di non tossicità, pretossicità, tossicità acuta e cronica e stimolazione.

Il saggio di tossicità cronica con *Selenastrum* è risultato il più sensibile.

E' emerso preponderante il fenomeno della biostimolazione per *Vibrio* e per il saggio di germinazione ed allungamento radicale sui semi utilizzati.

Alcuni campioni sono risultati tossici per più organismi presentando in alcuni casi sia tossicità acuta che cronica.

INTRODUZIONE

Molteplici studi hanno ormai fornito evidenza sperimentale al fatto che il solo approccio chimico-analitico non fornisce gli strumenti sufficienti per definire il rischio ambientale associato ad una miscela di inquinanti. Il ricorso a saggi ecotossicologici consente di valutare da un lato la frazione biodisponibile degli inquinanti, dall'altro eventuali fenomeni di sinergia e/o antagonismo tra sostanze diverse. (Baudo e Muntau, 1985; Calabrese, 1994; Cairns, 1995)

Per restituire un quadro il più possibile completo ed affidabile della matrice indagata l'approccio ecotossicologico deve essere basato su una batteria di test che impiegano organismi appartenenti a differenti livelli trofici e che comprenda sia test acuti, che cronici. (Filipic, 1995; Dell'Orto *et al.*, 1997; Pasini *et al.* 2000). La valutazione delle tossicità associate ad endpoint diversi incrementa infatti il valore predittivo di questi saggi. (Bierkens *et al.* 1998).

I dati presentati si riferiscono all'attività condotta nei primi sei mesi del 2001 presso il laboratorio di biologia ambientale dell'ARPA di Pavia, relativamente a controlli riguardanti varie matrici acquose (acque superficiali, di scarico di depuratori civili, di pozzi piezometrici per il controllo di discariche, interstiziali di sedimenti fluviali)(fig.1). Per questa indagine sono stati scelti i saggi applicabili a matrici acquose maggiormente diffusi presso i laboratori di biologia ambientale e previsti dal D.L. 152/99. Gli organismi test sono: il crostaceo *Daphnia magna* ed il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*, per test acuti; l'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum* per test cronici. Ad essi è stato aggiunto il saggio di germinazione ed allungamento radicale (su *Lepidium sativum*, *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*) applicato esclusivamente ai sedimenti (tab.1). In tal modo sono stati impiegati organismi a differente complessità e rappresentativi di vari livelli trofici (produttori, consumatori, decompositori).

L'approccio metodologico qui impiegato, rappresenta parte di quanto attualmente svolto dal nostro laboratorio al fine di ridurre, nell'ambito dei controlli routinari, il livello di incertezza associato alla caratterizzazione della qualità delle matrici indagate.

Figura 1-Tipologia dei campioni sottoposti ai test ecotossicologici.

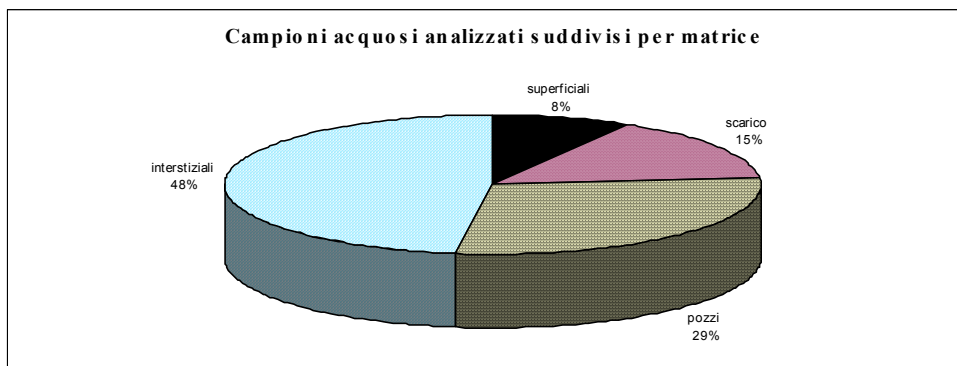


Tabella 1- Matrici acquose analizzate e rispettivi test utilizzati.

	<i>Daphnia magna</i> 24h	<i>Vibrio fischeri</i> 30'	<i>Selenastum capricornutum</i> 72h	<i>Lactuca sativa</i> <i>Lepidium sativum</i> <i>Cucumis sativus</i> 72h
Acque di scarico (depuratori civili)	■		■	
Acque superficiali (fiumi)	■		■	
Pozzi piezometrici (discariche)	■	■	■	
Acque interstiziali e sedimenti	■	■		■

MATERIALI E METODI

Test di tossicità acuta a 24 h con *Daphnia magna*

Sono stati utilizzati organismi di età inferiore alle 24 h.

Il test è stato condotto a 20°C su campioni di acqua tal quale con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio (IRSA, 1993). Alla fine della prova è stata valutata la mortalità delle dafnie espressa come percentuale di organismi immobili. Un campione è considerato tossico per percentuali di immobilità $\geq 20\%$. I campioni che hanno causato una percentuale di effetto pari al 10 % sono stati considerati come "pretossici". Si è scelto di evidenziare graficamente questi casi, che solitamente vengono assimilati al bianco, in quanto in tutti i testimoni allestiti si è sempre osservata una mortalità pari allo 0%.

Test di tossicità acuta a 30' con *Vibrio fischeri*

La bioluminescenza emessa da una popolazione monospecifica di batteri Gram-negativi appartenenti alla specie *Vibrio fischeri* è stata utilizzata per un saggio a 30 minuti per la determinazione della percentuale di effetto (inibizione/stimolazione) rispetto al controllo (Protocollo interno ispirato ai metodi IRSA,1996). La prova è stata effettuata su campioni filtrati su membrana di cellulosa da 0.45 μm . Si considerano tossici i campioni per cui viene registrata una

percentuale di effetto (inibizione) $\geq 20\%$. Sono stati considerati stimolanti solo i composti che hanno causato una percentuale di effetto (stimolazione) $\geq 20\%$.

Test di fitotossicità a 72 h con *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* e *Lepidium sativum*.

Il test di fitotossicità (germinazione ed allungamento radicale) è stato effettuato con tre semi, lattuga cetriolo e crescione sui sedimenti. I campioni sono stati utilizzati “in toto” al fine di ridurre al minimo la manipolazione (Baudo, comunicazione personale). Il saggio (IRSA,1983) è stato condotto per 72 ore al buio ed a 25 °C. Alla fine della prova sono stati registrati il numero dei semi germinati e la lunghezza radicale; i due valori sono stati combinati in Indice di Germinazione. I valori superiori alla fascia di variabilità del controllo sono stati indicati come stimolazione, quelli inferiori come tossicità.

Test di tossicità cronica a 72h con *Selenastrum capricornutum*

Una coltura pura di *Selenastrum capricornutum* viene esposta a diluizioni scalari del campione da testare, nelle condizioni previste da Rampa et al. 2000. Il test algale miniaturizzato utilizza piastre a 24 pozzetti e per ogni replica utilizza un volume di 2ml. La piastra è incubata in agitazione per 72h. La tossicità del campione è valutata in base all’inibizione della crescita algale.

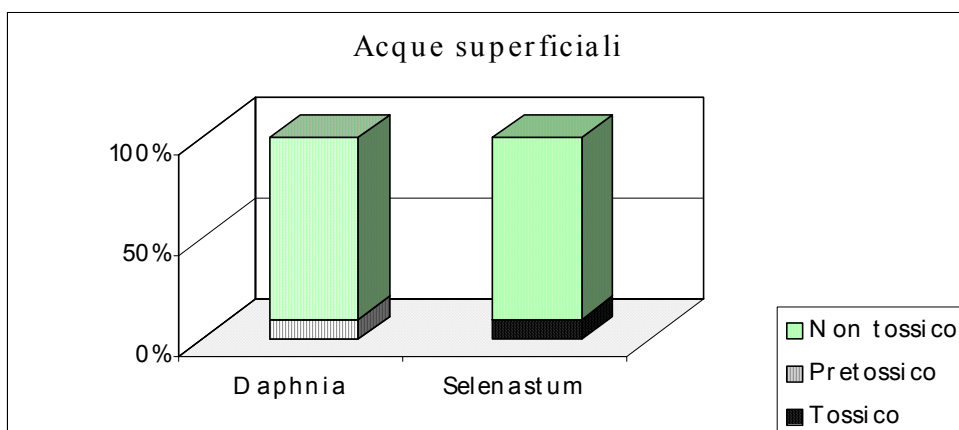
Un campione è considerato tossico o stimolante per % di effetto (rispettivamente diminuzione o incremento del tasso di crescita rispetto al controllo) $\geq 20\%$.

RISULTATI

Nei grafici che seguono i risultati sono riportati separatamente per ciascuna matrice. Gli istogrammi raffigurano, a seconda dell’organismo test impiegato, la percentuale di campioni che hanno dato effetti tossici, non tossici e, ove compatibile con il tipo di saggio, di stimolazione. Per quanto riguarda il test acuto con *Daphnia magna*, si è ritenuto opportuno evidenziare anche i dati relativi alle percentuali di effetto del 10%, che sono stati etichettati come “pretossici”. In questo modo è possibile osservare, per ciascuna matrice acquosa analizzata, gli organismi che nel complesso si sono mostrati maggiormente sensibili.

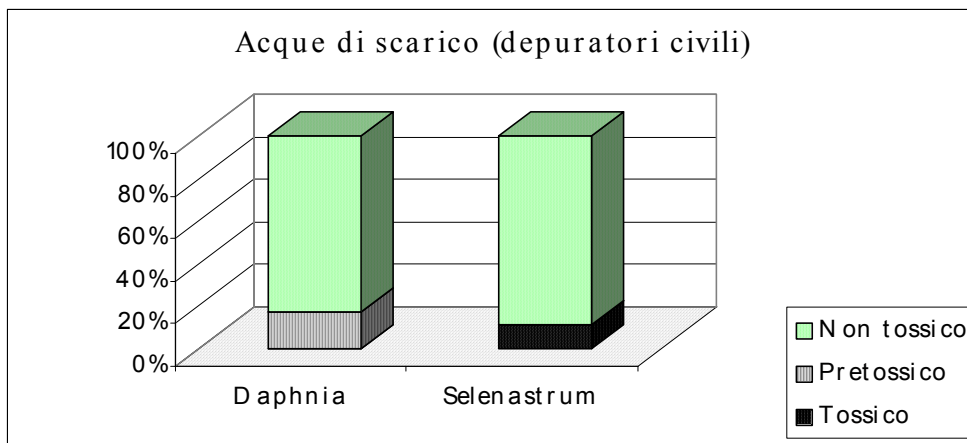
Per quanto riguarda le acque superficiali (fig.2), come ci si potrebbe attendere, pochissimi campioni sono risultati tossici e solo relativamente al test cronico su *Selenastrum*. E’ inoltre interessante notare come l’ unico campione che ha dato tossicità su *Selenastrum* è anche lo stesso che ha causato un effetto acuto del 10% su *Daphnia*, registrando così una corrispondenza tra le risposte.

Figura 2-Acque superficiali: distribuzione percentuale degli effetti osservati in *Daphnia* e *Selenastrum*.



Anche per quanto riguarda le acque di scarico dei depuratori civili (fig.3), la percentuale di campioni che ha causato effetti tossici è abbastanza bassa, anche in questo caso si è evidenziata una parziale concordanza tra tossicità emersa con il test cronico e “pretossicità”acuta (2 casi su 3). Sono inoltre assenti effetti di stimolazione sulla crescita algale, ad indicare il modesto impatto eutrofizzante di tali scarichi.

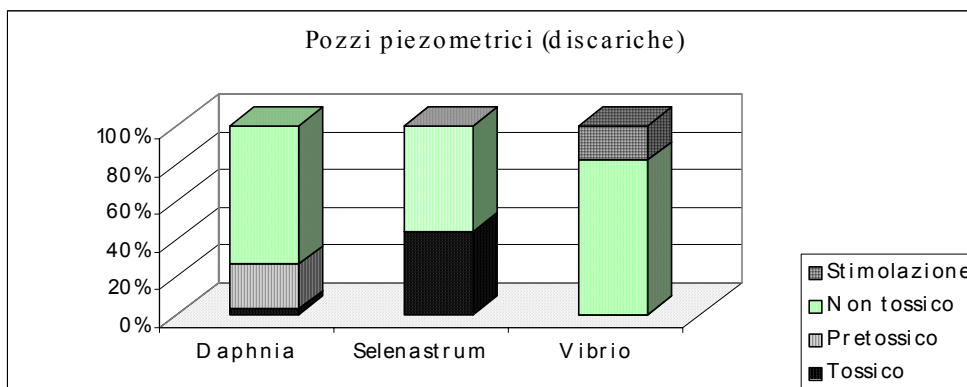
Figura 3-Acque di scarico: distribuzione percentuale degli effetti osservati in *Daphnia* e *Selenastrum*.



Nella figura 4 sono riportati i dati riferiti ai campioni provenienti dai pozzi piezometrici di controllo delle discariche. Effetti tossici sono stati registrati con maggior frequenza nel saggio cronico (44%), tuttavia non mancano alcuni casi di tossicità acuta anche a carico di *Daphnia*.

Se si considerano anche i casi di “pretossicità”acuta la corrispondenza tra campioni che hanno dato risposte tossiche nei due saggi è circa del 40%. Un dato di tutta evidenza è la risposta stimolante osservata a carico di *Vibrio* (18% dei campioni); con lo stesso saggio non sono mai stati registrati episodi di tossicità acuta. Nella metà di questi casi (3 su 6) la stimolazione corrisponde a risposte tossiche in entrambi gli altri saggi.

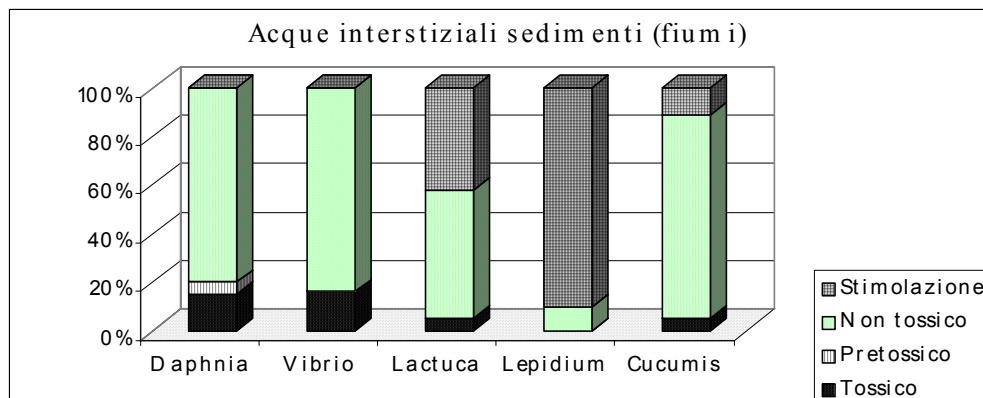
Figura 4-Acque di pozzi piezometrici: distribuzione percentuale degli effetti osservati in *Daphnia*, *Vibrio* e *Selenastrum*.



L'ultima figura (fig.5) illustra i risultati raccolti sulle acque interstiziali dei sedimenti testate con *Daphnia* e *Vibrio*, cui sono stati affiancati i saggi di germinazione ed allungamento radicale sui

sedimenti in toto (i semi assorbono l'acqua interstiziale che veicola i soluti in equilibrio con la parte solida del sedimento). Sia i test con *Daphnia*, che quelli con *Vibrio* hanno rivelato alcuni casi di tossicità acuta (16% sul totale dei campioni) con una limitata corrispondenza nei risultati. Le risposte ottenute dal saggio di fitotossicità variano molto a seconda della specie impiegata. In generale si vede come le risposte di inibizione siano assai rare mentre sono assolutamente preponderanti i casi di stimolazione, specialmente per quanto riguarda *Lepidium* (89%).

Figura 5-Acque interstiziali: distribuzione percentuale degli effetti osservati in *Daphnia*, *Vibrio*, *Lactuca*, *Lepidium* e *Cucumis*.



DISCUSSIONE

Il saggio che in assoluto si è rivelato più sensibile, è il saggio di tossicità cronica su *Selenastrum*. Ciò è dovuto non solo alla particolare sensibilità dell'organismo test, ma anche al fatto che esso è stato impiegato in un saggio di tipo cronico. Infatti le 72h di contatto tra il campione da testare e le alghe sono, rispetto al ciclo vitale di questi organismi, un tempo sufficiente ad evidenziare effetti di tipo cronico, cioè determinati da basse concentrazioni di inquinanti. Si tratta di informazioni assai preziose per la valutazione dei rischi cui può essere sottoposto un ecosistema ove gli organismi sono a contatto per lunghi periodi con una miscela di inquinanti a concentrazioni non rilevabili mediante test di tipo acuto (Viganò, 2000).

Un fenomeno spesso emerso è quello della biostimolazione sia nell'ambito del saggio con *Vibrio fischeri*, che del saggio di germinazione ed allungamento radicale. Per quanto riguarda i batteri bioluminescenti, la stimolazione si è verificata esclusivamente nel caso dei pozzi piezometrici. L'incremento del parametro misurato potrebbe indicare la presenza di un elemento di disturbo nei campioni che hanno generato questo tipo di risposta. A questo proposito è stato sottolineato come nella metà dei casi di stimolazione sono state ottenute risposte di tipo tossico in entrambi gli altri saggi. Per quanto riguarda invece il saggio di Germinazione ed allungamento radicale, alcuni studi hanno mostrato che la presenza di nutrienti nell'ambiente non influenza queste fasi della crescita degli organismi (Baudo, 1985), pertanto la stimolazione o ormesi è da alcuni autori indicata come una risposta a basse concentrazioni di inquinanti nell'ambiente (Wang, 1995). Sia in un caso che nell'altro, la rilevanza ecotossicologica di questo fenomeno risulta tutt'altro che chiarita.

Per ogni matrice esaminata, solo in una minoranza di casi, i campioni testati hanno dato risposte tossiche in più di un saggio. Lungi dal rappresentare una contraddizione, la variabilità riscontrata nelle risposte, rappresenta una conferma dell'affidabilità dell'approccio metodologico impiegato, consentendo inoltre di evidenziare come maggiormente problematiche le situazioni in cui il campione esaminato è risultato tossico per più di un organismo. I risultati ottenuti suggeriscono infine l'opportunità di inserire abitualmente nella batteria di saggi utilizzata, anche un saggio di tipo cronico.

Bibliografia

Baudo R., Mountau H. 1985. Riflessioni sulle "aree problematiche" in ecotossicologia *Acqua-Aria* 4: 331-339.

Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G. Comparative sensivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*. Vol.37: 2935-2947.

Cairns J. Niederlehner B.R. 1995 Predictive ecotoxicology. In Casarett L. and Doull's J. (Eds.). *Toxicology*. Mc-Graw-Hill, New York, USA: 13-33.

Calabrese E.J. 1994 Biological effects of low level exposures. Lewis Publishers, Boca Raton, USA: 302.

Dell'Orto N., Ciccotelli M. Cantelli D. Camatini M. 1997 Sviluppo di un sistema di biomonitoraggio a tre componenti per la valutazione della qualità delle acque. *Acqua-Aria* 5:103-107.

Filipic M, 1995 Mutagenicity and toxicity of water extracts from Sora river area. *Mutation Research*, 342:1-8.

IRSA 1993 Saggi di tossicità con *Daphnia magna*- Atti della giornata di studio organizzata dall'Istituto Superiore per la Ricerca sulle Acque- Quaderno:1.1-9.11.

IRSA, 1983: Analisi della fitotossicità della sostanza organica in decomposizione mediante bioassaggio *Lepidium sativum*.- Metodi Analitici per i Fanghi: Parametri biochimici e biologici-Quaderno IRSA, 64:8.1-8.3.

IRSA, 1996: Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti. Notiziario dei metodi analitici. ISSN:0392-1425.

Pasini MA., Gazzola M., Secondi A., Villa M. Monitoraggio di corpi idrici superficiali mediante test ecotossicologici multispecie su acque e sedimenti. Atti del Convegno nazionale di Ecotossicologia. Torino, 2000. Pp. 78-83.

Rampa P.L., Occelli C., Ferraro M., Gaffodio A.M., Fassina E., Radium P. Test di inibizione della crescita algale su matrici acquose: metodo miniaturizzato. Atti del Convegno nazionale di Ecotossicologia. Torino, 2000. Pp. 49- 52.

Viganò L. 2000 .Assessment of the toxicity of river Po sediments with *Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic toxicology*, 47 :191-202

Wang W., Freemark K. 1995 The use of plants for environmental monitoring and assesment. *Ecotoxicology and environmental safety*. 30: 289-301.