

RICERCA E APPLICAZIONE DI METODOLOGIE ECOTOSSICOLOGICHE

L'ECOTOSSICOLOGIA COME STRUMENTO DI GESTIONE DEGLI AMBIENTI ACQUATICI E TERRESTRI

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

ATTI DELLE GIORNATE DI STUDIO

8^a edizione
Giornate di Studio
26-28 novembre 2018

Camera di Commercio
Piazza del Municipio, 48 - Livorno



8th Biannual ECOTOxicology MEeting (BECOME 2018)

Organizzato da:



ECOTOX LDB

Con il supporto di:



MicroBioTests™

sartorius

Con il patrocinio di:





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

GIORNATE DI STUDIO - 8^a EDIZIONE

**Atti delle giornate di studio su:
l'ecotossicologia come strumento
di gestione degli ambienti acquatici
e terrestri**

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

ATTI

Livorno, 26-28 novembre 2018

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

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

ISPRA, Atti 2019
ISBN 978-88-448-0954-6

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
ISPRA

Grafica di copertina: Sonia Poponessi
Foto di copertina: Silvia Giuliani

Coordinamento pubblicazione on line:
Daria Mazzella
ISPRA - Area Comunicazione

GIUGNO 2019

A cura di:

Cristian Mugnai (ISPPA CN - COS)

INDICE

PREMESSA	6
Le piante nel monitoraggio ambientale: effetti fitotossici e genotossici di diversi contaminanti	7
Indagine su biomarker di fitotossicità in <i>Lepidium sativum</i>	12
Is “green” braking possible? Comparative assessment of microparticles generated by traditional and innovative braking systems.	17
Linee cellulari umane (e non) nell'indagine di matrici ambientali e complesse.	22
Valutazione preliminare della tossicità acquatica di ingredienti cosmetici innovativi	26
Indagine preliminare sugli effetti del pfoa su stati embrionali di <i>Danio rerio</i> : un possibile indicatore di salute dell'ecosistema.....	31
Verso la validazione del test dei micronuclei con <i>Tradescantia</i> per il monitoraggio della genotossicità in ambiente alpino.....	36
Applicazione di test ecotossicologici su acque potabili.....	41
L'utilità dell'approccio ecotossicologico a tutela della salute del bagnante	46
Applicazione del protocollo analitico per la caratterizzazione ecotossicologica e chimica dei sedimenti (PRATO) dell'invaso della Valgrosina.....	51
Terreni provenienti da scavi meccanizzati: valutazione della loro ecotossicità.....	56
Valutazione della tossicità dei sedimenti degli invasi ai fini della fluitazione: il protocollo PrATo.....	62
Determinazione dei valori di fondo naturale dei sedimenti marini abruzzesi: la rivincita dell'ecotossicologia.....	68

Sviluppo di “mappe (eco)tossicologiche” e loro applicazione nel risk assessment del fiume ledra.....73

PREMESSA

L'8ª 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 la Camera di Commercio, dal 26 al 28 novembre 2018.

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 34 comunicazioni scientifiche e 52 poster.

Gli argomenti trattati nelle varie sessioni hanno considerato: nuove frontiere nell'indagine ecotossicologica; criticità e sviluppi applicativi dell'ecotossicologia rispetto alla normativa vigente; l'ecotossicologia nella gestione ambientale e nell'analisi del rischio ecologico.

Rispetto alle edizioni precedenti, è stato dato ampio spazio alla discussione, partendo dalla prima giornata con i focus group attraverso la tecnica del mutual survey, fino ad arrivare alla tavola rotonda propedeutica all'avvio delle sessioni.

Di seguito si riportano i contributi tecnico scientifici i cui autori hanno autorizzato la pubblicazione come ATTI della 8ª edizione delle Giornate di Studio "Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate".

Cristian Mugnai

LE PIANTE NEL MONITORAGGIO AMBIENTALE: EFFETTI FITOTOSSICI E GENOTOSSICI DI DIVERSI CONTAMINANTI

by L. Giorgetti ^a, L. Bellani ^{ab}, S. Muccifora ^b, E. Tassi ^c, C. Spanò ^d, S. Bottega ^d, F. Barbieri ^b, M. Ruffini Castiglione ^d

^aIstituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, UOS Pisa, CNR, Via Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italia - email: l.giorgetti@ibba.cnr.it

^bDipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Via A. Moro 2, 53100 Siena, Italia - email: lorenza.bellani@unisi.it; simonetta.muccifora@unisi.it; barbierfrance88@gmail.com

^c Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri, UOS Pisa, CNR, Via Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italia - email: elianalanfranca.tassi@cnr.it

^dDipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via Ghini 13, 56126 Pisa, Italia - email: carmelina.spano@unipi.it; stefania.bottega@unipi.it; monica.ruffini.castiglione@unipi.it

Abstract - Le piante con il loro stile di vita sessile, la loro struttura e fisiologia, entrano direttamente in contatto con le matrici ambientali, suolo, acqua e aria. Proprio per queste prerogative, gli studi di monitoraggio ambientale basati sui sistemi vegetali possono essere molto indicativi del reale stato di salute dell'ambiente. I saggi biologici sulle piante permettono di analizzare gli effetti di contaminanti a dispersione naturale o antropica (metalli pesanti, sostanze organiche e aromatiche, nanoparticelle, etc) e sono molto vantaggiosi, economici, ad alta sensibilità e correlabili con risultati ottenuti su sistemi animali. Questi saggi, possono considerare diversi endpoints: parametri fisiologici e morfologici (effetti fitotossici); produzione di enzimi e molecole legate alla risposta a stress; effetti su attività mitotica e ciclo cellulare (effetti citotossici); danni al DNA da attività clastogenica e mutagenica (effetti genotossici); danni ultrastrutturali. Inoltre questi test permettono di valutare il danno acuto o cronico in seguito ad esposizioni più o meno lunghe ai contaminanti.

A conferma dell'efficienza di questo metodo di indagine si riportano studi effettuati nei nostri laboratori su piante modello di interesse agrario (*Vicia faba*, *V. sativa*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare* e *Zea mays*) esposte a diversi inquinanti e valutate attraverso un approccio multidisciplinare.

Keywords: monitoraggio ambientale, fitotossicità, genotossicità, contaminanti, ultrastruttura

Introduzione

Le piante interagiscono direttamente con l'ambiente terrestre e atmosferico, sono altamente sensibili ai diversi contaminanti e possiedono risposte cellulari simili a quelle degli organismi animali, ma il loro utilizzo nella sperimentazione dal punto di vista etico è più accettabile e più facilmente realizzabile (Blinova 2004; Arambasíc et al., 1995). Pertanto l'uso delle piante per saggi di tossicità ha acquisito notevole valore negli ultimi decenni con sperimentazioni effettuate sia *in vivo* che *in vitro*.

Il processo di germinazione del seme rappresenta l'evento più critico nella formazione della futura pianta (Dash e Panda, 2001). Il saggio di fitotossicità rappresenta l'approccio sperimentale più immediato per valutare l'effetto di un potenziale contaminante sulla germinazione dei semi e sulla crescita del germoglio (effetto acuto) e, in tempi più lunghi, a livello del ciclo vitale della pianta (effetto cronico) (Martignon, 2009). Le specie modello comunemente utilizzate sono *Lepidium sativum* L., *Cucumis sativus* L. e *Lactuca sativa* L. (Baudo et al., 2007). I parametri (endpoints) analizzabili possono essere molteplici e complessi come percentuale di germinazione e lunghezza della radice primaria, sviluppo della biomassa, contenuto di clorofilla o altri pigmenti fotosintetici, attività enzimatiche e contenuto di metaboliti secondari, che possono variare in risposta allo stress. Inoltre si possono valutare gli effetti genotossici dei contaminanti ambientali utilizzando il meristema radicale di piante modello come *Vicia faba* L. e *Allium cepa* L. Le analisi sono mirate alla valutazione di possibili alterazioni del ciclo cellulare, e/o dei danni al patrimonio genetico, questi ultimi rilevati anche dal test del micronucleo (Giorgetti et al., 2011; Barbafieri e Giorgetti, 2016; Ruffini Castiglione et al., 2015; Cotelle et al., 2015).

Il nostro gruppo di ricerca è da anni attivo nell'uso delle piante per monitorare contaminanti di varia natura in diverse matrici ambientali.

Materiali e metodi

-Saggi di fitotossicità: gli endpoints considerati sono la percentuale di germinazione e la lunghezza della radice dopo 72 ore di trattamento.

-Saggi di genotossicità: effettuati tramite analisi citologica dell'apice radicale mediante colorazione di Feulgen e valutazione dell'indice mitotico, delle aberrazioni citologiche e dell'eventuale presenza di micronuclei.

-Studi ultrastrutturali: mirati alla caratterizzazione dei contaminanti, ad esempio nanoparticelle (NP) di biossido di titanio (TiO₂) per valutarne la forma e le dimensioni, alla determinazione delle modalità di internalizzazione e all'identificazione di eventuali alterazioni dell'ultrastruttura.

-Analisi delle attività enzimatiche: determinazione degli enzimi coinvolti nello stress ossidativo derivato dall'esposizione ai diversi tipi di contaminanti mediante approccio istochimico e saggi biochimici.

Risultati

In Tabella 1 sono riportate le specie vegetali, i contaminanti e le matrici ambientali valutate con gli approcci sopra riportati a rappresentare alcuni esempi degli studi effettuati negli ultimi anni dal nostro gruppo di ricerca.

Tabella 1.

Piante utilizzate	Contaminanti:	Matrici ambientali:	Pubblicazioni
<i>Vicia faba</i> , <i>Allium cepa</i> , <i>Lactuca sativa</i>	Organici e inorganici	Acque reflue	Giorgetti et al. 2011. Di Gregorio et al. 2015.
<i>Vicia faba</i>	PAHs	Suolo (ex situ bioremediation in biopila)	Ruffini Castiglione et al. 2016.
<i>Vicia faba</i>	Boro	Suolo	Barbafieri & Giorgetti 2016.
<i>Vicia sativa</i> L.	CuBr ₂	Acqua	Bellani et al. 2014. Muccifora & Bellani 2013
<i>Vicia faba minor</i> <i>Zea mays</i>	NP di TiO ₂	Acqua	Ruffini Castiglione et al. 2011. Ruffini Castiglione et al. 2016.
<i>Vicia narbonensis</i>	NP di TiO ₂	Acqua	Ruffini Castiglione et al. 2015.
<i>Helianthus annuus</i>	NP di CeO ₂	Suolo (+B)	Tassi et al. 2017.
<i>Raphanus sativus</i>	Nanotubi di Halloysite	Acqua	Bellani et al. 2016.
<i>Pisum sativum</i>	NP di TiO ₂	Suolo (+fango)	Giorgetti et al. 2019.

Discussione

I saggi effettuati hanno permesso di analizzare gli effetti di contaminanti a dispersione naturale o antropica come metalli pesanti, sostanze organiche, aromatiche, NP in diversi sistemi vegetali.

In particolare gli studi più complessi e più recenti sono stati effettuati su contaminanti emergenti costituiti da NP di TiO₂ che sono tra le più diffuse e utilizzate in molti settori industriali (cosmetici, prodotti autopulenti, filtri solari, vernici, industria alimentare, farmaceutica) e in campo medico. L'approccio sperimentale multidisciplinare da noi impiegato è basato sul test di fitotossicità e sull'analisi citogenetica e test del micronucleo (Fig. 1), sull'analisi al microscopio elettronico a trasmissione (Fig. 2) e sull'analisi di variazioni di attività enzimatiche con approccio biochimico e istochimico. Queste analisi hanno evidenziato che le NP di TiO₂ possono causare tossicità a diversi livelli, a seconda delle loro dimensioni e forma e della matrice ambientale in cui sono presenti.

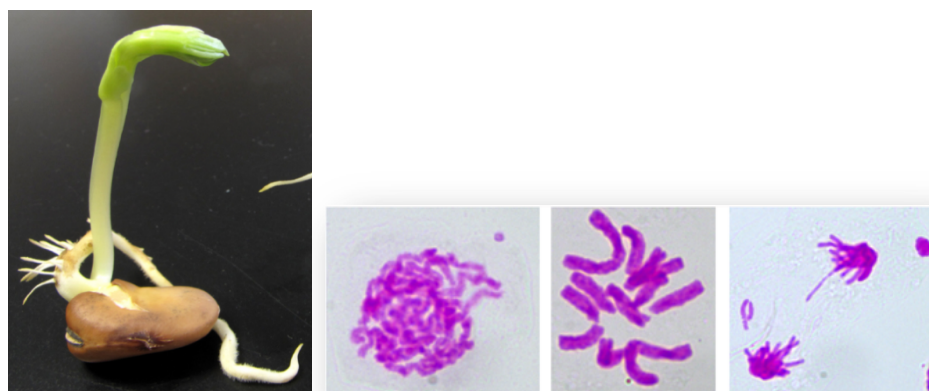


Figura 1. Test di fito-genotossicità in *Vicia faba* L.

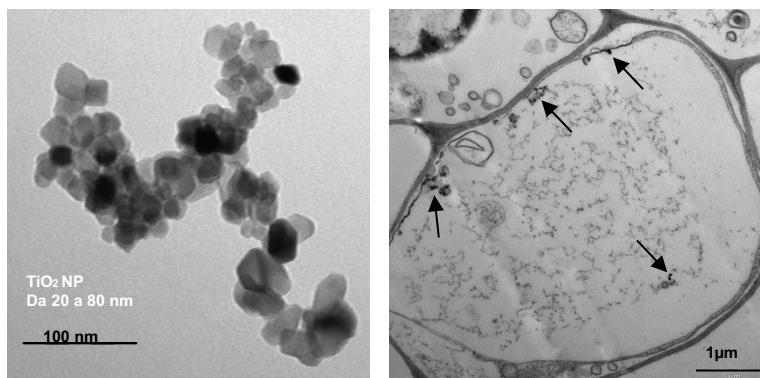


Figura 2. Analisi al microscopio elettronico di NP di TiO_2 isolate ed in cellule di radici di *Pisum sativum* L. (frecce).

Conclusioni

Considerando l'importanza delle piante negli studi di ecotossicologia possiamo concludere che i test di fitotossicità e genotossicità forniscono informazioni immediate e importanti per la valutazione degli effetti di contaminanti ambientali.

L'approccio multidisciplinare permette di valutare molti parametri sia ambientali che biologici favorendo una maggiore comprensione dei meccanismi cellulari implicati nella risposta della pianta alle diverse sostanze e delle interazioni contaminante-matrice-pianta.

Nel caso degli studi effettuati sulle NP i nostri risultati suggeriscono una riflessione sulla possibile tossicità di NP e di nanomateriali largamente usati e che, immessi nell'ambiente, possono accumularsi nelle diverse matrici raggiungendo la catena alimentare e quindi procurando danni agli organismi viventi.

Bibliografia

Arambašić MB, Bjelić S, Subakov G 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigations and the practical applications. *Water Res* 29: 497-503.

Barbafieri M, Giorgetti L 2016. Contaminant bioavailability in soil and phytotoxicity/genotoxicity tests in *Vicia faba* L.: a case study of boron contamination. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 24327-24336.

Baudo R, Beltrami M, Gazzola M 2007. Presentazione dei risultati dell'interconfronto sulla determinazione degli effetti tossici di sostanze presenti in matrici solide sulla germinazione e allungamento radicale di semi di monocotiledoni e dicotiledoni. In: M Beltrami e R Baudo Atti 8° Workshop Fitotox. Edizioni CNR - ISE, Verbania: 27-116.

Bellani L, Giorgetti L, Riela S, Lazzara G, Scialabba A, Massaro M 2016. Ecotoxicity of halloysite nano tube-supported Palladium nanoparticles in *Raphanus sativus* L. *Environ Toxicol Chem* 35: 2503-2510.

Bellani L, Muccifora S, Giorgetti L 2014. Response to copper bromide exposure in *Vicia sativa* L. seeds: Analysis of genotoxicity, nucleolar activity and mineral profile. *Ecotox Environ Saf* 107: 245-250.

Blinova I 2004. Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environ Toxicol* 19: 425–428.

Cotelle S, Dhyèvre A, Muller S, Chenon P, Manier N, Pandard P, Echairi A, Silvestre J, Guiesse M, Pinelli E, Giorgetti L, Barbafieri M, Silva VC, Engel F, Radetski CM 2015. Soil genotoxicity assessment results of an interlaboratory study on the *Vicia micronucleus* assay in the context of ISO standardization. *Environ Sci Pollut Res Int* 22: 988-995.

Dash M, Panda SK 2001. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biol Plant* 44: 587-589.

Di Gregorio S, Giorgetti L, Ruffini Castiglione M, Mariotti L, Lorenzi R 2015. Phytoremediation for improving the quality of effluents from a conventional tannery wastewater treatment plants. *Int J Environ Sci Technol* 12: 1387–1400.

Giorgetti L, Spanò C, Muccifora S, Bellani L, Tassi E, Bottega S, Di Gregorio S, Siracusa G, Sanità di Toppi L, Ruffini Castiglione M 2019. An integrated approach to highlight biological responses of *Pisum sativum* root to nano-TiO₂ exposure in a biosolid-amended agricultural soil. *Sci Total Environ* 10: 2705-2716.

Giorgetti L, Talouizte H, Merzouki M, Caltavuturo L, Geri C, Frassinetti S 2011. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: a case study. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 2275-2283.

Martignon G 2009. Linee guida per la misura della tossicità dei suoli. Test di fitotossicità per il suolo. CESI RICERCA-ASV Ambiente e Sviluppo Sostenibile.

Muccifora S, Bellani L 2013. Effects of copper on germination and reserve mobilization in *Vicia sativa* L. seeds. *Environ Pollut* 179: 68-74.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Becarelli S, Siracusa G, Lorenzi R, Di Gregorio S 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 7930-7941.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Bellani L, Muccifora S, Bottega S, Spanò C 2016. Root responses to different types of TiO₂ nanoparticles and bulk counterpart in plant model system *Vicia faba* L. *Environ Exp Bot* 130: 11-21.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Cremonini R, Bottega S, Spanò C 2015. Impact of TiO₂ nanoparticles on *Vicia narbonensis* L.: potential toxicity effects. *Protoplasma* 251: 1471-1479.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R 2011. The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *J Nano Res* 13: 2443-2449.

Tassi E, Giorgetti L, Morelli E, Peralta-Videa J R, Gardea-Torresdey J L, Barbafieri M 2017. Physiological and biochemical responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to nano-CeO₂ and excess boron: Modulation of boron phytotoxicity. *Plant Physiol Biochem* 110: 50-58.

INDAGINE SU BIOMARKER DI FITOTOSSICITÀ IN *LEPIDIUM SATIVUM*

by N. Guerrieri^a, L. Fantozzi^a, A. Lami^a, L. Scaglioni^b

^a CNR-IRSA Istituto di Ricerca sulle Acque, sede Verbania, Largo Tonolli, 50, 28922-Verbania – nicoletta.guerrieri@cnr.it, laura.fantozzi@cnr.it, andrea.lami@cnr.it

^b DeFENS, Università degli Studi di Milano, via Celoria, 2, 20133-Milano – leonardo.scaglioni@unimi.it

Abstract - La risposta metabolica delle piante allo stress da metalli pesanti è molto diversificata e migliorarne la conoscenza è utile al fine di comprendere meglio gli effetti biologici di sostanze potenzialmente tossiche. Il *Lepidium sativum* (crescita comune) viene utilizzato comunemente come organismo biondicatore in test di germinazione che utilizzano diversi standard e procedure di crescita e che valutano la germinazione e l'allungamento radicale dei semi. Nel presente lavoro è stato utilizzato il protocollo UNI CHIM 1651:2003 per valutare la risposta dei semi di *Lepidium sativum* all'esposizione alle acque arsenico ferruginose del Rio Rosso campionate in Valle Anzasca, e in sistemi modello contenenti arsenico, alluminio, solfato di ferro, solfato di sodio, solfato di rame e soluzione di Hoagland. Sono stati misurati sia la germinazione che l'IG%. Le analisi sono state effettuate sia misurando con centimetro che tramite acquisizione di immagine ed elaborazione dati tramite software. La risposta di *Lepidium sativum* nei campioni testati ha evidenziato sia biostimolazione che inibizione. In alcuni campioni sono stati analizzati i carotenoidi, sia totali che con HPLC, per approfondire la risposta metabolica indotta dall'esposizione ai metalli pesanti.

Keywords: Arsenico, metalli, *Lepidium sativum*, sistemi modello, carotenoidi

Introduzione

Il test di fitotossicità, metodo UNICHIM 1651:2003, è utilizzato in ecotossicologia per la valutazione della tossicità di acque e sedimenti su semi di diverse specie vegetali, valutando al termine del saggio il numero di semi germinati e la lunghezza dell'apparato radicale o del germoglio sviluppato da ciascuno di essi. In questo studio abbiamo approfondito la conoscenza degli effetti ecotossicologici sia di acque naturalmente ricche in metalli sia di acque arricchite e utilizzate come sistemi modello, valutando la loro capacità di stimolare o inibire l'allungamento radicale in semi di *Lepidium sativum*, utilizzato come unico organismo test vegetale. I sistemi modello utilizzati sono stati scelti come supporto a lavori precedenti su acque di superficie ad elevato contenuto in metalli e acque geotermali (Guerrieri et al. 2017). L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando moderni sistemi di acquisizione ed elaborazione di immagini. Si sono effettuate analisi preliminari sui carotenoidi contenuti nei germogli, è stata effettuata la loro caratterizzazione e quantificazione allo scopo di trovare altri biomarkers per integrare i dati di fitotossicità e comprendere meglio i meccanismi di azione delle sostanze tossiche negli organismi considerati.

Materiali e metodi

Mediante il test di germinazione e allungamento radicale (metodo UNICHIM 1651:2003) sono stati analizzati i semi di crescione (*Lepidium sativum*) in diversi sistemi modello: soluzioni acquose di acqua Milli Q come riferimento, soluzioni di arseniato bibasico di sodio, di solfato di rame, di alluminio cloruro, di solfato di ferro, di solfato di sodio, soluzione di Hoagland (Soluzione salina Hoagland's n.2, Sigma H 2395) utilizzata per lo sviluppo dei semi in coltura idroponica (Ashan et al. 2010) e acque del Rio Rosso, un torrente alpino della Valle Anzasca in Piemonte, ricco di acque termali fredde arsenico-ferruginose (campionamento del 8/10/2015).

L'indice di germinazione percentuale (IG%) è stato calcolato misurando l'allungamento radicale dei germogli sia manualmente con il centimetro che mediante analisi dell'immagine, con programmi di misura (Windows: IC measure; Mac: ScreenRuler),

I carotenoidi sono stati estratti, in acetone al 90%, a 4 °C, per 14 ore al buio. Sono stati utilizzati 500 mg di germogli di crescione omogenizzati (Ultra Turrax T45) e 1.5 ml di solvente, i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti. L'estratto è stato utilizzato per quantificare sia i carotenoidi totali mediante metodo spettrofotometrico (UV mc2, SAFAS) (Lami et al, 2000) che i singoli carotenoidi mediante Cromatografia Liquida ad Alta Pressione (HPLC; Ultimate 3000 system, ThermoFisher), equipaggiato con un detector DAD ed utilizzando il metodo descritto in Lami et al., 2000.

Risultati

La lunghezza dei germogli di crescione è stata misurata sia manualmente con un righello graduato che tramite software di misura. Sono stati utilizzati due software analoghi per computer Mac e Windows, i dati sono analoghi. In Fig.1 viene riportata l'immagine di germogli di crescione cresciuti in acqua Milli Q.

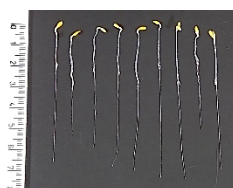


Figura 1. Germogli di *Lepidium sativum* in acqua Milli Q

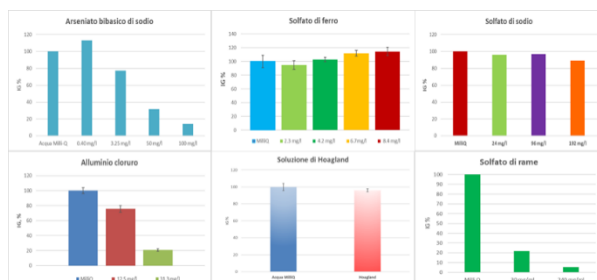


Figura 2. IG% semi di *Lepidium sativum* test in sistemi modello

Le misure effettuate sui semi germogliati sono state utilizzate per calcolare IG% dei semi testati in sistemi modello differenti (Fig.2). I risultati ottenuti mostrano che l'arseniato bibasico è leggermente stimolante a basse concentrazioni mentre a concentrazioni superiori a 3.25 mg/ml inizia ad avere un effetto di inibizione. Il solfato di ferro non ha nessun effetto sull'allungamento radicolare di *Lepidium sativum* fino a 4.2 mg/ml e poi provoca una piccola stimolazione. Il solfato di sodio, invece, ad alte concentrazioni provoca una piccola inibizione. Il cloruro di alluminio a concentrazioni crescenti ha un effetto inibente sullo sviluppo di *Lepidium sativum*. I risultati del test effettuati con la soluzione di Hoagland e con le acque del Rio Rosso (non mostrato in figura) non mostrano differenze significative con l'acqua di controllo Milli Q. Il solfato di rame, come è noto ha un effetto inibente che cresce all'aumentare della sua concentrazione, ed è stato utilizzato come controllo positivo per la fitotossicità. I carotenoidi estratti dai germogli di *Lepidium sativum* in acetone al 90% sono stati caratterizzati mediante HPLC (Fig.3). Campioni testati nell'acqua Milli Q e nel Rio Rosso mostrano profili cromatografici simili. La clorofilla è sempre assente, essendo cresciuti in assenza di luce, sono presenti principalmente violaxantina e luteina in rapporto 1:3, piccole quantità di beta carotene e composti intermedi precursori dei carotenoidi presenti nella figura come picchi di identificazione(Fig.3).

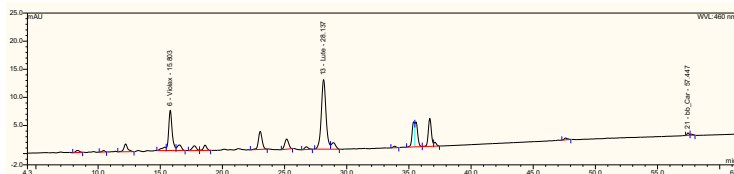


Figura 3. HPLC carotenoidi estratti da semi di *Lepidium sativum* in acqua Milli Q

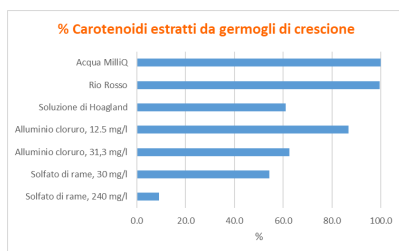


Figura 4. Quantificazione dei carotenoidi estratti da semi di *Lepidium sativum* in alcuni sistemi modello

I carotenoidi totali dei germogli di crescita nei diversi sistemi modello sono stati quantificati con un'analisi spettrofotometrica fra 350 e 750 nm. L'acqua Milli Q è stata utilizzata come riferimento (Fig.4), la quantità di carotenoidi nell'acqua del Rio Rosso è simile all'acqua Milli Q, la soluzione di Hoagland mostra di avere un significativo effetto di riduzione nella produzione di carotenoidi in *Lepidium sativum*. L'alluminio cloruro e il solfato di rame, mostrano un effetto di riduzione nella produzione di carotenoidi. Alla concentrazione di 30 mg/ml l'alluminio cloruro e il solfato di rame mostrano una percentuale di riduzione simile. Il solfato di rame ad elevate concentrazioni (240 mg/ml) riduce la concentrazione dei carotenoidi a valori inferiori al 10%.

Discussione

Il calcolo dell'IG % mediante acquisizione delle immagini ed elaborazione dei risultati tramite software mostra notevoli vantaggi rispetto al metodo manuale: ottima riproducibilità, minimizzazione degli errori, possibile analisi di altri parametri morfologici, tempi ridotti di misura e minimizzazione del deterioramento del campione che può essere sottoposto ad ulteriori analisi. L'IG% del *Lepidium sativum* mostra o inibizioni molto marcate, rame ed arsenico, prevedibili ad alte concentrazioni e un piccolo effetto stimolante a basse concentrazioni di arsenico e in presenza di altre molecole, come osservato anche in lavori precedenti (Guerrieri et al. 2017), il loro effetto deve essere ulteriormente approfondito.

La soluzione di Hoagland, utilizzata in idroponica e da alcuni autori come riferimento (Ashan et al. 2010), mostra un IG % simile all'acqua Milli Q. I germogli cresciuti nella soluzione di Hoagland pesano di più dei germogli cresciuti in acqua Milli Q, nonostante che l'allungamento radicale sia simile (0.67 g per l'acqua Milli Q e 0.70 g per la soluzione di Hoagland) (peso fresco, media di 12 set di piastre in triplo) questo rapporto è ancora più marcato se si confronta il peso secco nell'esperimento dei carotenoidi. I carotenoidi nei campioni testati con la soluzione di Hoagland sono quantitativamente inferiori, in maniera analoga ai semi in cui è presente inibizione della crescita. Ulteriori indagini sono necessarie per chiarire questi dati. Dall'analisi cromatografica si evidenzia che luteina e violaxantina sono i due carotenoidi più abbondanti e caratteristici durante la fase di sviluppo in assenza di luce. La luteina, in presenza di luce viene inserita nel fotosistema II, la violaxantina, in presenza di luce, viene invece trasformata in zeaxantina. La violaxantina/zeaxantina associata alle proteine contribuisce alla protezione del fotosistema II, libera nella membrana ha invece un ruolo di protezione della membrana tilacoide dai radicali liberi (Jahns et al. 2012). Un ulteriore approfondimento potrà chiarire il ruolo di questi carotenoidi nello sviluppo del germoglio e le loro relazioni con le sostanze tossiche.

Conclusioni

L'utilizzo di altri biomarkers e l'approfondimento del loro ruolo fisiologico potrà migliorare la comprensione della risposta degli organismi vegetali alle sostanze tossiche. Gli organismi vegetali nell'ambiente svolgono un ruolo fondamentale come servizi ecosistemici, non solo per la produzione di ossigeno, il sequestro di anidride carbonica, la produzione di alimenti e materiali ma anche per il risanamento e la riqualificazione delle acque e dei suoli alterati e/o inquinati da attività antropiche. Il mondo vegetale ha elaborato nei diversi organismi vegetali strategie efficaci per sequestrare sostanze tossiche i cui meccanismi non sono ancora completamente compresi.

Bibliografia

Ahsan N, Lee, D-G, Kim K-H, Alam I, Lee S-H, Lee K-W, Lee H, Lee B-H 2010. Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere* 78: 224-231.

Jahns P, Holzwarth AR 2012. The role of xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 182-193.

Guerrieri N, Cavalca L, Corsini A, Scaglioni L 2017. Test di fitotossicità su acque di diversa tipologia contenenti arsenico. In atti l'Ecotossicologia come strumento di gestione, ISPRA 7-12.

Lami A, Marchetto A, Lo Bianco R, Appleby PG, Guilizzoni, P 2000. The last ca 2000 years palaeolimnology of Lake Candia (N. Italy): inorganic geochemistry, fossil pigments and temperature time-series analyses. *Journal of Limnology* 59:31-46.

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.

IS “GREEN” BRAKING POSSIBLE? COMPARATIVE ASSESSMENT OF MICROPARTICLES GENERATED BY TRADITIONAL AND INNOVATIVE BRAKING SYSTEMS.

by S. Maiorana^a, F. Teoldi^a, S. Silvani^b, A. Mancini^c, A. Sanguineti^d, D. Dupin^d, T. Sanvito^e, A. Bonfanti^d, D. Baderna^a and E. Benfenati^d

^a Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell’Ambiente, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS - diego.baderna@marionegri.it

^b Laboratorio di Ingegneria dei Tessuti per la Medicina Rigenerativa, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS - sara.silvani@marionegri.it

^c Brembo S.p.a

^d Cidetec Nanomedicine (Spain) - ddupin@cidetec.es

^e EOS S.r.l. - tiziano.sanvito@eosinstruments.com

Abstract - Air pollution is a stressor negatively affecting human health and the environment, causing or exacerbating cardiovascular and respiratory diseases in humans and altering aquatic and terrestrial ecosystems as a result of the diffusion and deposition of particulate matter. Brake wear can contribute up to 20% to traffic-related PM10 emissions and can therefore be considered a source of microparticle pollution. The proposed study aims to evaluate the ecotoxicological potential of the particles emitted during braking. The experimental approach included the exposure of some aquatic and terrestrial models to the coarse material generated in the laboratory with benches simulating driving conditions and braking in urban areas. Traditional phenolic-based and innovative cement-based pads developed within the LIFE+ COBRA project have been tested. The results were also compared with the environmental levels potentially found in the environment to define whether there really is a short-term ecological risk.

Keywords: brake pad wear debris; phytotoxicity, LIFE+ COBRA; root damage; brakes

Introduction

Road traffic is one of the main anthropogenic sources influencing air quality. Traffic-related emissions include gas and particles that can affect human and environmental health. It has been estimated that more than 400.000 deaths per year in EU28 were due to particulate matters. While the impact of combustion emissions has been widely studied, less attention were dedicated to non-exhaust emissions such as tire and brake pad debris. Brake wear can be considered a source of microparticle pollution: in fact, it contributes up to 20% to traffic-related PM10 emissions. Only limited information on the impact of brake pad wear debris (BPWD) are present in literature.

The LIFE + COBRA project [LIFE13 ENV/IT/000492] aims to improve air quality by reducing the emission from brakes. The reduction is achieved by creating a pad with less less impact than those available on the market. The main feature of the innovative pads is that the phenolic binders were replaced by cement-based hydraulic

binders. In this study we investigated the ecotoxicological potential of the particles emitted during braking on terrestrial and aquatic model organisms.

Materials and methods

Wear debris were generated from traditional (TBP) and cementitious (CBP) pads during a dedicated bench test on a full-scale dynamometer simulating actual urban driving conditions. Debris were collected directly on a stainless tray placed below the dynamometer in the bench. Bigger debris were removed before the BPWD were transferred into glass Petri dishes for storage. BPWD were stored at 4 °C protected from light until needed. Wear debris from each brake pad during the bench test was characterized for chemical composition, shape and dimension by SEM/EDXS microscopy and Single Particle Extinction and Scattering (SPES) optical technology.

The acute phytotoxicity test was done with cress (*Lepidium sativum*) seeds grown in artificial OECD standard soil spiked with increasing concentrations of wear debris obtained from cementitious or traditional brake pads. Effects of wear debris on plant germination and root growth were measured coupled to root damages evaluation with the Evans Blue staining of injured cells from the apical region due to loss of plasma membrane integrity.

For the aquatic toxicity, the acute immobilization assay with *Daphnia magna* and the algal growth inhibition assay with *Raphidocelis subcapitata* were done following the OECD 202 and 201 guidelines respectively.

Results

The characterization of wear debris showed a different elemental composition of the materials from the two pads while no significant difference in terms of appearance and morphology was observed from SEM micrographs. Highly heterogeneous populations of particle material in size (from 1 to 10 µm), with shape like small plates, aggregated or not, were found in both samples.

The impact of wear debris on plant growth was examined using cress seed and considering germination rate, root elongation and root damages. No significant differences were found in the germination rate of cress seeds with any treatment: germination rate was $95 \pm 5.8\%$ in the untreated group and from $90 \pm 10\%$ to $100 \pm 0\%$ in seeds grown in soil contaminated with debris from both brake pads.

Root elongation was affected significantly by wear debris from traditional pads: seedlings were generally shorter in soil contaminated with those debris but root elongations were statistically different from untreated groups only in plants exposed to the highest concentration (10 g/kg) of debris (root growth was $57.65 \pm 15.84\%$ of the control). The overall effect of wear debris on seedlings was also evaluated by the germination index (GI) as integrated influence on both germination and growth, resulting in a clear dose-response effect in seeds exposed to debris from traditional brake pads while no effects were recorded in seedlings grown in soil contaminated with debris from the cementitious pads (Figure 1). Evans Blue assay was done on the exposed seedlings to evaluate root

damages as loss of plasma membrane integrity. Root damages were statistically different from the untreated roots only in seedling exposed to 5 and 10 g/kg of

debris from traditional pads while new pads were able to induce significant damages only at the higher dose.

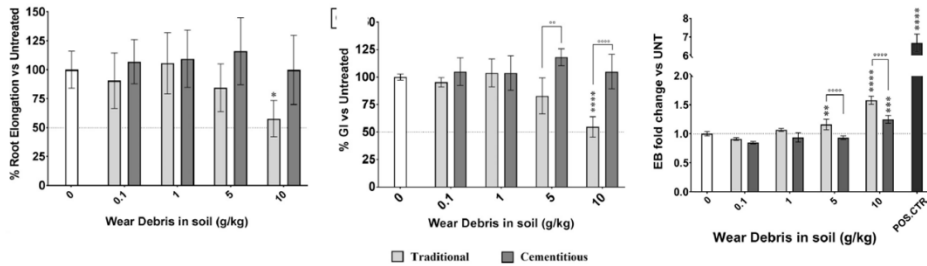


Figure 1. Effects of wear debris on cress seeds.

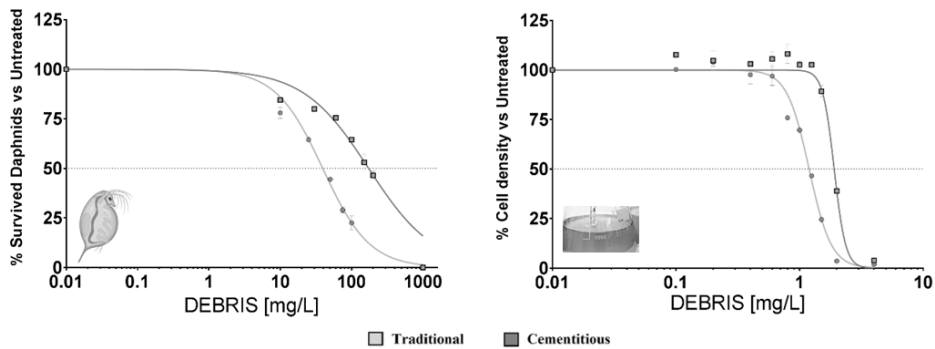


Figure 2. Effects of wear debris on aquatic organisms

Aquatic toxicity of wear debris was investigated through the 48h immobilization assay with *Daphnia magna* and the 72h algal growth inhibition assay with *Raphidocelis subcapitata* (Figure 2). The test with *D. magna* showed a concentration-dependent toxicity to the freshwater crustaceans with greater toxicity induced by the debris from the cementitious pads. Toxicity was only partially attributable for both samples to the water-soluble component [WAF data not shown]. The greater toxicity of debris from the cement pads was also confirmed by the algal test. Algae resulted more sensible to the BPWD toxicity, especially when the organisms are exposed to the water suspension of the particles.

Discussion

Previous studies estimated that the most representative fraction in total dust collected from different road sites are represented by particulate matter from traffic brakes: it has been reported that brakes can contribute between 11 and 21% to total traffic-related PM10 emissions in urban environments and half of the total brake wear may deposit in the roadside sites. The ecotoxicological potential of brake pad wear debris has raised growing concerns in the recent years as these waste materials can be considered non-point sources of metals and various organic substances. Both human and ecological receptors can be affected by BPWD but only few evidences were found about the effects of traffic-related non-exhaust emission on bacteria, aquatic macrophytes and terrestrial plants. In our study, the experimental design has based on the hypothesis that the heaviest coarse debris are deposited near the emission point without being transported far from the source as it happens for the smaller and lighter particles. Considering this potential environmental scenario, we investigated the influence of BPWD from traditional phenolic resin-based pads and innovative cement-based pads on cress seed, daphnids and green algae as model organisms for terrestrial plants and freshwater organisms.

Our results showed that BPWD from traditional brake pads were able to markedly lowered the %GI at higher concentrations while no effects were found in seedlings exposed to cementitious-based debris. The study showed that the negative effects are mainly on the roots that are shorter and more damaged as measured by the Evans blue assays. Opposite results were highlighted by the evaluation of aquatic toxicity: both daphnids and algae, in fact, were affected more by water suspension of BPWD from the new cement-based pads.

Conclusions

The acute phytotoxicity test coupled to the evaluation of root damages was successfully applied in the study of the adverse effects induced by wear debris on terrestrial plants. Further studies are required to clarify the potential risk associated with the release of wear debris into the environment, in particular the noxious effects on other water organisms.

Acknowledgments

This work was developed under the framework of the LIFE+ Project COBRA [LIFE13 ENV/IT/000492].

References

- Dodd, M.D., Ebbs, S.D., Gibson, D.J., Filip, P., 2014. Alteration of root growth by lettuce, wheat and soybean in response to wear debris from automotive brake pads. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 67, 557–564.
- Grigoratos, T., Martini, G., 2015. Brake wear particle emissions: a review. Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (4), 2491–2504.
- Maiorana, S., Teoldi, F., Silvani, S. et al. (2019). Phytotoxicity of wear debris from traditional and innovative brake pads. Environment International 123, 156–163.

Martignon, G., 2009. Linee guida per la misura della tossicità dei suoli Test di fitotossicità per il suolo. In: CESI RICERCA-ASV Ambiente e Sviluppo Sostenibile (document in Italian), Available at: <http://www.rse-web.it/documenti/documento/1996>, Accessed date: 16 January 2018.

Perricone, G., Wahlström, J., Olofsson, U., 2015. Towards a test stand for standardized measurements of the brake emissions. Proc. IMechE D J. Automob. Eng. <https://doi.org/10.1177/0954407015616025>.

LINEE CELLULARI UMANE (E NON) NELL'INDAGINE DI MATRICI AMBIENTALI E COMPLESSE.

by *Diego Baderna e Emilio Benfenati*

Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'Ambiente, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS – diego.baderna@marionegri.it

Abstract -. Le linee cellulari umane e animali sono utilizzate da anni negli studi di tossicologia classica ed in farmacologia ma sono ancora scarsamente utilizzate in tossicologia ambientale e negli studi di monitoraggio nonostante questi modelli presentino alcune caratteristiche idonee al loro utilizzo anche in questo campo (es. disponibilità, accessibilità, versatilità). Il contributo presenta l'approccio del Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'Ambiente e l'applicazione di questi modelli *in vitro* in alcuni casi studio all'interno dei quali i ricercatori hanno utilizzato alcune linee cellulari prevalentemente umane per la valutazione della qualità dei suoli e dell'aria e per la valutazione tossicologica di alcune matrici ambientali non convenzionali come il percolato di discarica e il particolato aerodisperso.

Keywords: in vitro, linee cellulari, risk assessment, metodi alternativi

Introduzione

Il legame tra qualità ambientale e salute umana è noto ormai da diverso tempo: oltre alle influenze del "verde" sul benessere psico-sociale, l'inquinamento ambientale causa effetti negativi sulla salute della popolazione inducendo l'insorgenza di nuove patologie o aggravando patologie preesistenti.

Nonostante la connessione uomo-ambiente, i monitoraggi ambientali vengono tuttoggi svolti, nei migliori dei casi, con l'utilizzo di saggi ecotossicologici che impiegano organismi modello di tutti i regni ma senza l'inclusione di saggi che possano fornire informazioni più o meno dirette sui potenziali effetti indotti nell'uomo. La potenziale pericolosità per la salute umana è generalmente valutata quasi esclusivamente mediante applicazione delle linee guida internazionali per l'analisi del rischio dei contaminanti precedentemente identificati dalle analisi chimiche delle matrici in esame. L'informazione risultante ha però due importanti limitazioni: è basata sui soli composti identificati dalle analisi e non considera l'interazione sinergica, additiva o antagonista di eventuali contaminanti presenti contemporaneamente nella matrice ambientale studiata.

È necessario, quindi, individuare degli strumenti e delle metodiche che possano fornire informazioni rilevanti per la salute umana e che presentino caratteristiche tecniche ed economiche tali da renderli facilmente integrabili nei piani di monitoraggio.

Le linee cellulari sono storicamente utilizzate negli studi di tossicologia ed in farmacologia ma sono ancora scarsamente utilizzate in tossicologia ambientale e negli studi di monitoraggio nonostante questi modelli presentino alcune caratteristiche idonee al loro utilizzo anche in questi campi (es. disponibilità, accessibilità, versatilità).

Lo scopo di questo lavoro è presentare l'approccio adottato dal Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'Ambiente presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS per l'indagine di matrici ambientali e complesse con modelli *in vitro*, prevalentemente di origine umana.

Materiali e metodi

L'approccio proposto è basato sulla scelta di modelli cellulari che possano rispecchiare le principali vie di esposizione agli inquinanti per i recettori umani, considerando sia le tipologie di rischio proposte dalle linee guida nazionali ed internazionali per l'analisi del rischio dei siti contaminanti sia quanto già adottato in precedenza da altri gruppi.

Gli autori hanno effettuato una revisione della letteratura esistente evidenziando i modelli cellulari (Tabella 1) e gli endpoint (Tabella 2) più frequentemente utilizzati nella valutazione di matrici ambientali e complessi.

È stato quindi derivato un elenco di modelli cellulari potenzialmente applicabili come supporto all'analisi del rischio. A questo elenco è stato aggiunto anche il test di trasformazione cellulare con la linea Balb/c 3T3 clone A31-1-1 che è stato recentemente proposto come metodo alternativo per la cancerogenesi.

Tabella 1. Linee cellulari maggiormente utilizzate in tossicologia ambientale in vitro

Nome della linea	Tessuto/Organo sorgente
A549 - adenocarcinoma alveolare	Alveoli/Polmone
BEAS-2B - epitelio bronchiale normale immortalizzato	Bronchi/Polmone
HepG2 - epatocarcinoma	Fegato
MCF-7 - adenocarcinoma del seno	Seno
Cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC)	Sangue
Reporter-gene assays (es. sistemi CALUX)	Vari

Tabella 2. Endpoints più frequentemente applicati nell'indagine in vitro delle matrici ambientali.

Endpoints	Tipologia di Saggio
Effetti sulla vitalità cellulare e sulla proliferazione	MTT e derivati, saggio del tripan blue, misurazione dell'ATP.
Citotossicità e apoptosi	rilascio di LDH, saggio del tripan blue, attivazione delle caspasi, saggio dell'annexina V.
Attività di interferenza endocrina	E-Screen, Reporter-gene assays
Genotossicità	Comet test, Micronuclei, attivazione di geni e pathways.

L'approccio proposto è stato applicato in alcuni siti oggetto di monitoraggio da parte del gruppo di ricerca e per la valutazione del potenziale impatto di una matrice complessa quale il percolato di discarica.

Risultati

Nel caso studio riguardante i suoli della Valle dell'Olona, le cellule HepG2 sono state trattate con concentrazioni crescenti di estratto organico dei suoli campionati in zone agricole (Figura 1A) e zone urbane (Figura 1B). È stato rilevato un effetto antiproliferativo concentrazione-dipendente indotto con maggiore entità dai suoli di tipo agricolo.

Nel monitoraggio del particolato atmosferico nella Valle dell'Olona, le cellule A549 (Figure 1C) e BEAS-2B (Figure 1D) sono state esposte agli estratti organici del particolato aerodisperso per 72 ore valutando giornalmente gli effetti indotti sulla proliferazione. L'estratto di PM10 è risultato particolarmente tossico in entrambi i modelli ma tutte e tre le tipologie di polveri sono state in grado di inibire la proliferazione cellulare con un effetto concentrazione- e tempo-dipendente.

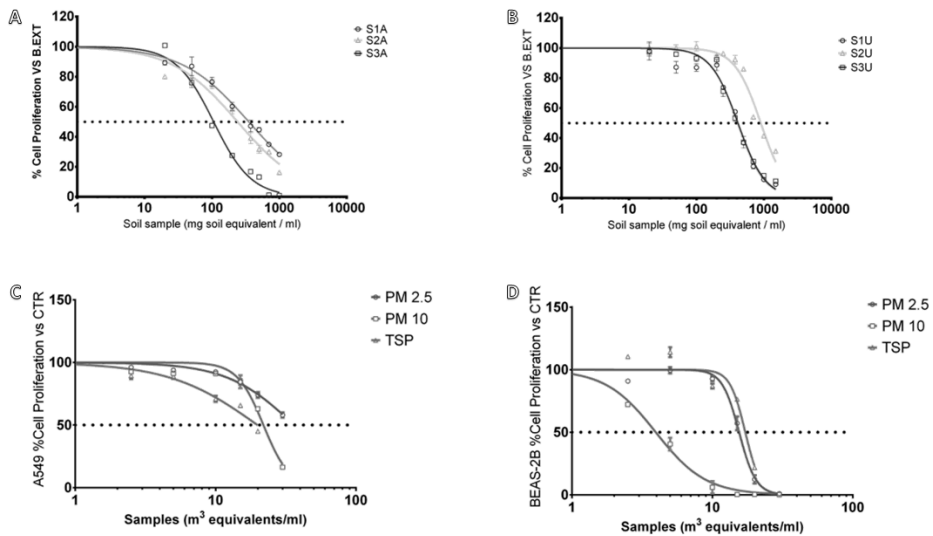


Figura 1. Effetti antiproliferativi indotti dagli estratti organici di suoli (A e B) e polveri aerodisperse campionate nella Valle dell'Olona.

Infine, le cellule HepG2 sono state trattate per 72 ore con percolato proveniente da una discarica di rifiuti industriali del Nord Italia valutando giornalmente gli effetti indotti sulla proliferazione cellulare (Figura 2). Lo stesso percolato è stato poi estratto con diclorometano ottenendo un estratto organico e un residuo idrosolubile.

Il percolato è in grado di inibire la proliferazione in modo concentrazione- e tempo-dipendente. Lo stesso trend è stato osservato anche nelle cellule esposte al percolato privato della componente organica, suggerendo che l'effetto tossico del percolato sia dovuto principalmente alla componente inorganica (metalli e ammoniacale).

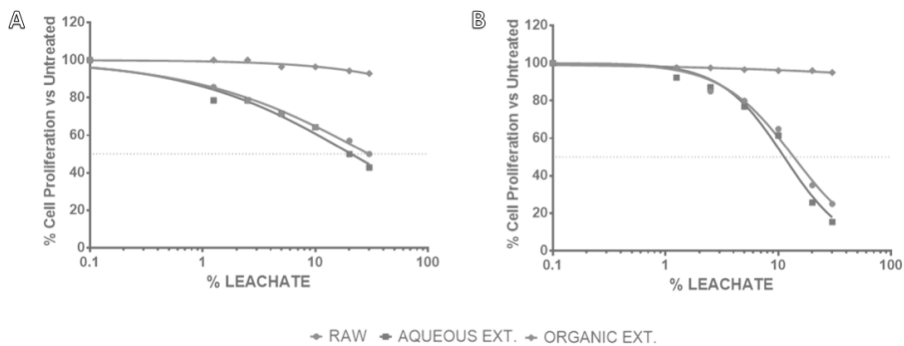


Figura 2. Effetti antiproliferativi indotti dal percolato di discarica e dalla frazione idrosolubile o organica dopo 24 (A) e 72 (B) ore di esposizione.

Discussione e conclusioni

Le linee cellulari possono essere considerate una metodologia consolidata, ampiamente diffusa ed in continua evoluzione.

L'ampia disponibilità di modelli cellulari rappresentativi dei potenziali organi bersaglio nell'uomo e di tecniche volte alla misurazione di diversi endpoints rende questi tools versatili e adatti anche agli studi in ambito ambientale.

Lo sviluppo tecnologico verificatosi negli ultimi anni nel settore della tossicologia *in vitro* ha inoltre permesso di migliorare sia le linee cellulari che i protocolli analitici in modo da rendere i modelli *in vitro* sempre più vicini alla complessità biologica dei sistemi *in vivo*.

Ad oggi non è stata definita una batteria di saggi biologici che possa fornire informazioni circa il potenziale impatto di xenobiotici o matrici ambientale contaminate sulla salute umana e da utilizzare anche nei piani di monitoraggio. I modelli *in vitro* possono essere utilizzati in questo ruolo, integrando le informazioni derivanti dalle analisi chimiche e dai saggi ecotossicologici.

Bibliografia

Baderna et al., 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays. *Environ. Res.* 111: 603-613.

Baderna et al., 2013. Chemical-based risk assessment and *in vitro* models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona valley. *Sci. Total Environ.* 463-464, 790-801.

Baderna et al., 2014. Soil quality in the Lomellina area using *in vitro* models and ecotoxicological assays. *Environ. Res.* 133: 220-231.

Baderna, D., Caloni, F. and Benfenati, E. 2019. Investigating landfill leachate toxicity *in vitro*: A review of cell models and endpoints. *Environ Int* 122, 21-30.

Teoldi et al., 2017. Air quality in the Olona Valley and *in vitro* human health effects. *Sci Total Environ.* 579:1929-1939.

VALUTAZIONE PRELIMINARE DELLA TOSSICITÀ ACQUATICA DI INGREDIENTI COSMETICI INNOVATIVI

by D. Baderna^a, S. Maiorana^a, D. Morelló-Bolumar^b, E. Gallor^b, V. J. Nebot^b, D. Dupin^c, E. Benfenati^b, Consorzio Pepticaps^d

^a Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'Ambiente, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS - diego.baderna@marionegri.it

^b Polypeptide Therapeutic Solutions S.L. (Spain) - vnebot@pts-polypeptides.com

^c Cidetec Nanomedicine (Spain) - ddupin@cidetec.es

^d www.pepticaps.eu

Abstract -. L'industria cosmetica è un settore in forte espansione e il numero di ingredienti e formulazioni immessi sul mercato ogni anno è in continua crescita.

L'utilizzo di questi prodotti nel quotidiano comporta però il loro continuo rilascio nell'ambiente assieme agli altri personal care products, tanto che alcuni di questi prodotti sono stati identificati dalla EU Water Framework Directive come contaminanti emergenti, in particolare per l'ecosistema acquatico.

Il progetto Horizon2020 Pepticaps ha come obiettivo la produzione di nuove nanocapsule che siano contemporaneamente sia efficienti nell'incapsulamento e nella protezione di principi attivi da utilizzare nella cosmesi della pelle sia environmental-friendly.

Lo studio qui proposto vuole valutare la tossicità dei copolimeri che costituiscono le nanocapsule mediante saggi ecotossicologici con organismi modello di acqua dolce e la definizione di potenziali scenari espositivi ambientali per la stima dei livelli riscontrabili nelle acque superficiali.

Keywords: copolimeri, cosmetici, contaminanti emergenti, Pepticaps, tossicità acquatica.

Introduzione

Numerosi composti chimici, naturali e di sintesi, vengono annualmente immersi nel mercato dall'industria cosmetica. Questi composti includono sia principi attivi che coadiuvanti quali gli stabilizzanti e i conservanti. L'utilizzo quotidiano dei prodotti cosmetici ed in generale dei personal care products e la creazione di un numero sempre maggiore di ingredienti e formulazioni ha causato un loro continuo rilascio nell'ambiente, tanto fare identificare alcuni di questi prodotti come contaminanti emergenti dalla EU Water Framework Directive, in particolare per l'ecosistema acquatico. Un interesse crescente è stato quindi riservato alla valutazione dell'impatto ambientale degli ingredienti cosmetici e, in parallelo, alla ricerca e sviluppo di molecole sempre più performanti ed environment-friendly.

La produzione di nuove nanocapsule che siano contemporaneamente sia efficienti nell'incapsulamento e nella protezione di principi attivi da utilizzare nella cosmesi della pelle sia a basso impatto ambientale è l'obiettivo del progetto Horizon2020 Pepticaps.

Lo studio ha valutato la tossicità acquatica dei copolimeri che costituiscono le nanocapsule mediante saggi ecotossicologici con organismi modello di acqua dolce.

Successivamente, alcuni scenari espositivi ambientali sono stati definiti per stimare i livelli potenzialmente riscontrabili nelle acque superficiali a seguito dell'utilizzo dei copolimeri all'interno di prodotti cosmetici di uso quotidiano.

Materiali e metodi

Sono stati studiati 4 nuovi copolimeri diblocco costituiti da un blocco idrofilico e un blocco polipeptico idrofobico. Il blocco polipeptidico caratterizza la funzione del copolimero stesso: sono stati sviluppati copolimeri non responsivi, elementi responsivi al pH, agli enzimi della pelle e sistemi duali che rispondono sia al pH che agli enzimi.

La valutazione della tossicità acquatica è stata condotta mediante applicazione del saggio di immobilizzazione con *Daphnia magna* secondo la linea guida OECD 202, il saggio di inibizione della crescita alagale con *Rhaphidocelis subcapitata* secondo la linea guida OECD 201 e il test di fitotossicità con la pianta acquatica *Spirodela polyrhiza*.

Sono stati definiti due scenari espositivi basati sull'utilizzo quotidiano di prodotti contenenti i copolimeri e su uno scenario ipotetico di incidente durante il trasporto dei copolimeri.

Lo scenario di utilizzo quotidiano ha tenuto conto della destinazione d'uso dei copolimeri che saranno impiegati in lozioni corpo e serum per il viso allo 0.1% in peso, ipotizzando i livelli ottenibili qualora 1 milione di abitanti utilizzino i prodotti e che il cosmetico non venga assorbito dalla pelle e che quindi sia presente nelle acque convogliate ad un depuratore che tratta giornalmente 432.000.000 litri di acqua [portata di uno dei depuratori di Milano].

È stato inoltre ipotizzato che il depuratore abbia un tasso di rimozione nullo e che quindi i copolimeri si riversino nel corpo idrico accettore [tabella 1].

Tabella 1. Carico di quotidiano di copolimeri a seguito dell'utilizzo quotidiano

Cosmetico	Dose (g)	Copolimero per dose (g)	Copolimero rilasciato quotidianamente (g)	Concentrazione copolimero all'uscita de depuratore (µg/L)
Body lotion	7.82	0.00782	7820	18.102
Face serum	1.54	0.00154	1540	3.565

Per lo scenario di incidente durante il trasporto, invece, è stato considerato che i copolimeri saranno disponibili in confezionamento da 1 a 5 kg e verranno trasportati come polveri. È stato poi ipotizzato uno sversamento accidentale di un intero lotto all'interno di del lago di Comabbio, uno dei più piccoli in Italia [tabella 2].

Si otterranno le seguenti concentrazioni nelle acque del lago: 3,68 o 18,38 µg/L rispettivamente per uno sversamento di 1 o 5 kg di copolimero.

Tabella 2. Concentrazione di copolimero nelle acque di un lago a seguito di un incidente durante il trasporto

Quantità trasportata (kg)	Superficie lago (m ²)	Profondità media (m)	Volume del lago (L)	Concentrazione di copolimero nelle acque (µg/L)
1	3.4E7	8	2.72E8	3.68
5				18.38

Risultati

I copolimeri possono essere classificati come non tossici per il saggio con *D. magna* in quanto la EC50 a 24 ore è risultata superior a 100 mg/L per ogni prodotto.

I copolimeri possono essere classificati come non tossici per il saggio con *R. subcapitata* in quanto la 72h NOErC a 72 ore è risultata superior a 100 mg/L per ogni prodotto, considerando come non effetto una variazione del 10% della crescita rispetto al controllo.

Infine, i copolimeri non inibiscono la crescita della prima fronda di *S. polyrhiza* nelle concentrazioni da noi testate (0.1, 1, 10, 100 e 1000 mg/L).

Nella tabella 3 sono riportati i valori sperimentali ottenuti nei tre saggi per ciascun copolimero

Tabella 3. Tossicità acquatica dei copolimeri: risultati dei saggi ecotossicologici

Copolimero	<i>D. magna</i>	<i>R. subcapitata</i>	<i>S. polyrhiza</i>
Non-reattivo	100	200	1000
Reattivo al pH	100	1000	100
Reattivo agli enzimi	100	1000	1000
Duale	1000	200	1000
I valori sono espressi come NOAEC (mg/L)			

In mancanza del dato sul terzo livello trofico (pesci), abbiamo definito la PNEC a partire dal dato registrato nella specie più sensibile e applicando un fattore di sicurezza pari a 1000. La PNEC risultante per i copolimeri di blocco è quindi 100 µg/L.

Nella tabella 4 sono riportati i risultati dell'analisi del rischio (HQ) dei livelli di copolimeri riscontrabili nelle acque sulla base degli scenari espositivi ipotizzati. L'analisi, basata sul rapporto PEC su PNEC, non ha evidenziato rischi per l'ambiente acquatico nelle condizioni da noi ipotizzate. I valori di HQ ottenuti anche considerando una PNEC conservativa sono, infatti, lontani dalla soglia di rischio.

Tabella 4. Analisi del rischio dei livelli risultanti dagli scenari espositivi

Scenario	PEC ($\mu\text{g/L}$)	PNEC ($\mu\text{g/L}$)	HQ
Utilizzo quotidiano dei cosmetici	18.102	100	0.181
	3.565		0.036
Incidente nel trasporto	3.68		0.037
	18.38		0.184

Discussione e conclusioni.

L'industria cosmetica è un mercato in continua crescita e annualmente sono introdotti sul mercato diversi ingredienti da impiegare in cosmetici e personal care products. L'utilizzo quotidiano di questi prodotti comporta un incremento dei livelli di questi prodotti o dei loro prodotti di degradazione nelle acque con potenziali effetti negativi sugli ecosistemi la cui entità e gravità sono ancora da studiare. Risulta quindi necessario considerare anche l'impatto ambientale di questi prodotti già in fase di ricerca e sviluppo in modo da ottenere prodotti performanti e ben tollerati dall'ambiente. Con questa ottica, il consorzio Pepticaps ha sviluppato una serie di copolimeri diblocco efficienti nell'incapsulamento e protezione di principi attivi da utilizzare nella cosmesi della pelle con un impatto ambientale trascurabile. I modelli *in silico* attualmente disponibili per la valutazione della tossicità acquatica non sono adatti a modellare la struttura complessa di questi nuovi copolimeri a causa di alcuni elementi caratteristici (catene PEG e polipeptidi) che risultano particolarmente complessi da valutare computazionalmente. Per confermare il basso impatto dei copolimeri sugli ecosistemi di acqua dolce, il nostro gruppo ha effettuato una valutazione preliminare esponendo daphnidi, alghe e piante acquatiche a concentrazioni crescenti di ciascun prodotto nuovo.

I risultati dei test ecotossicologici hanno classificato i copolimeri come non tossici per l'ambiente acquatico. Il gruppo ha derivato conservativamente una PNEC applicabile ai 4 copolimeri analizzati risultata pari a $100 \mu\text{g/L}$.

Questo valore è stato confrontato con le concentrazioni stimate da 4 scenari espositivi, più o meno complessi, allestiti sulla base di un utilizzo quotidiano dei prodotti contenenti i copolimeri o a seguito di un rilascio accidentale. Gli scenari espositivi ipotizzati possono essere considerati "worst cases" perchè escludono l'assorbimento del copolimero a livello dermico e la capacità dei depuratori di rimuovere questi composti biomimetici. Ulteriori studi di caratterizzazione delle molecole hanno dimostrato che l'assorbimento dermico di questi ingredienti innovativi sarà totale e quindi il rilascio ambientale a seguito del loro utilizzo può essere escluso.

Nonostante gli scenari molto conservativi, l'analisi del rischio non ha evidenziato potenziali rischi per l'ambiente acquatico sia in caso di rilascio dovuto ad uso dei cosmetici sia in caso di rilascio accidentale durante il trasporto.

Ringraziamenti

Il presente studio è stato finanziato dal progetto Horizon2020 PEPTICAPS (grant agreement 686141).

Bibliografia

OECD 2004. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OECD 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

Pepticaps consortium, 2018. Design of emulsifiers to produce safe, controlled and reliable novel stimuli-responsive nanocapsules for skin care applications.
<http://www.pepticaps.eu/>

INDAGINE PRELIMINARE SUGLI EFFETTI DEL PFOA SU STATI EMBRIONALI DI *DANIO RERIO*: UN POSSIBILE INDICATORE DI SALUTE DELL'ECOSISTEMA

*Ines Lacchetti**, Mario Carere, Walter Cristiano, Margherita Corti, Kevin Di Domenico, Silvana Caciolli e Laura Mancini

Reparto Ecosistemi e Salute, Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 – Roma

*ines.lacchetti@iss.it

Abstract

Tra le sostanze chimiche emergenti, gli acidi polifluoroalchilici e perfluoroalchilici (PFAS) rappresentano una delle più grandi attuali emergenze ambientali e sanitarie. Standard di Qualità Ambientale (SQA) per alcuni PFAS sono stati derivati attraverso la metodologia prevista dalla Direttiva Quadro Acque e riportati nell'ambito del dlgs 172/2015 che recepisce la Direttiva Europea 2013/39/UE; tuttavia, un aggiornamento della normativa sulla regolamentazione dei PFAS è necessario, anche tenendo conto degli effetti delle miscele di tali sostanze. Questo studio preliminare mira a investigare gli effetti dell'acido perfluorooctanoico (PFOA) sullo sviluppo embrionale del pesce zebra (*Danio rerio*); a tal fine, gli embrioni sono stati esposti per 96 ore a diverse concentrazioni di PFOA applicando il *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) test, come da linea guida OECD. Lo studio ha evidenziato, in via preliminare, alcuni effetti letali e subletali a diverse concentrazioni di PFOA: la loro analisi può ampliare la conoscenza dei possibili effetti avversi di questa sostanza sulla fauna ittica all'apice della catena trofica degli ecosistemi acquatici e di quelli indiretti anche sulla salute umana.

Keywords: PFAS, PFOA, *Danio rerio*, contaminanti emergenti, salute ecosistemi acquatici.

Introduzione

Gli acidi polifluoroalchilici e perfluoroalchilici (PFAS) appartengono a una classe composta da migliaia di molecole largamente utilizzate nell'industria, grazie alla loro resistenza ai grassi e all'acqua, per l'impermeabilizzazione di tessuti e la manifattura di contenitori per alimenti (Prevedouros et al. 2006); sono usati anche come componenti di vernici, adesivi, detersivi, prodotti per stampanti, pellicole fotografiche e materiali per microelettronica, schiume antiincendio. Di conseguenza i PFAS trovano applicazione giornaliera in un ampio spettro di attività quotidiane, con ampie ricadute economiche e commerciali, che determinano un continuo rilascio di tali sostanze negli ecosistemi acquatici principalmente, attraverso le acque reflue civili e industriali. L'impatto di tali composti chimici è inoltre amplificato a causa della loro elevata solubilità, persistenza e bioaccumulo lungo la catena trofica (Giesy e Kannan 2001; Martin et al. 2003; Ahrens e Bundschu 2014). Tali caratteristiche

rendono queste sostanze particolarmente pericolose per la salute degli organismi viventi e le configurano come una delle classi di contaminanti prioritari ed emergenti, il cui utilizzo necessita di essere regolamentato. A tal proposito, la normativa europea in materia di protezione e salvaguardia dell'ambiente acquatico (Direttiva Quadro Acque 2000/60/CE), ha classificato il PFOS come sostanza pericolosa e prioritaria, stabilendo le strategie di monitoraggio che ogni Stato Membro dell'Unione Europea deve impegnarsi ad adottare (2013/39/UE). Nonostante ciò, la conoscenza di una così ampia classe di molecole richiede sforzi di ricerca e regolatori che finora sono stati dedicati solo allo studio di relativamente poche sostanze i cui effetti (tossicologici ed ecotossicologici) e destino ambientale sono ancora da approfondire. Tale lacuna normativa necessita pertanto di essere colmata, soprattutto alla luce degli episodi di contaminazione ambientale avvenuti negli ultimi anni. Per esempio, come per primo evidenziato da uno studio dell'IRSA-CNR (Polesello et al. 2013), una vasta area della Regione Veneto è stata interessata da un massiccio scarico protratto nel tempo di queste sostanze chimiche nel sistema idrico. A tal proposito, è stato condotto un importante studio (Valsecchi et al. 2017) che ha permesso la derivazione di Standard di Qualità Ambientale (SQA) nell'ambito della normativa nazionale per la protezione dei corpi idrici superficiali. Gli SQA del PFOA, i cui effetti tossici sul sistema riproduttivo e immunitario sono noti (EFSA 2018), sono pari rispettivamente a 0.1 µg/L per le acque interne (laghi e fiumi) e 0.02 µg/L per le altre acque superficiali (acque marino costiere e acque di transizione).

L'obiettivo del presente studio, attualmente in fase preliminare, è quello di indagare gli effetti del PFOA, anche in forma di miscela con altri PFAS, su embrioni del pesce zebra (*Danio rerio*). La scelta di utilizzare in futuro le miscele è data dal fatto che la combinazione di più sostanze è spesso riscontrata nelle diverse matrici ambientali e può dare luogo a effetti sinergici che potrebbero non verificarsi con la presenza dei singoli composti (Ding et al. 2013). Questo studio è stato condotto utilizzando embrioni di *Danio rerio*, che rappresenta un modello estremamente valido nell'analisi e nel monitoraggio degli ecosistemi (Di Paolo et al., 2015; Cristiano et al. *Submitted*) in quanto possibile indicatore preliminare per gli effetti sulla salute degli ecosistemi acquatici incluso l'uomo.

Materiali e metodi

La tossicità del PFOA è stata valutata esponendo embrioni di *Danio rerio* per 96 ore in seguito alla fecondazione, a cinque diverse concentrazioni, tramite l'applicazione del *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) test, secondo le linee guida indicate nella OECD 236. Il test permette di rilevare i quattro endpoint di letalità previsti dalla normativa attraverso cui è possibile osservare l'arresto dello sviluppo e la morte dell'embrione: coagulazione dell'uovo fecondato, mancata formazione dei somiti, mancato distacco della coda e assenza di battito cardiaco. Per l'allestimento del test sono stati esposti 20 embrioni per ognuna delle concentrazioni selezionate; inoltre, sono state allestite piastre di controllo positivo e negativo (inter- e intra-piastre) come previsto dalla linea guida. I valori delle concentrazioni di PFOA utilizzate per questo test (0.1-500 mg/L) sono in linea con quelli di precedenti studi (Hagenaars et al., 2011; Ulhaq et al. 2013), riportati anche nel lavoro di Valsecchi et al. (2017). È stato scelto un *range* molto ampio di concentrazioni che ha permesso di valutare sia effetti letali che possibili effetti subletali nello sviluppo embrionale, potenzialmente riscontrabili anche alle concentrazioni più basse. L'analisi di questi effetti è necessaria per la comprensione degli effetti di tali composti sugli organismi acquatici (es. embriotossicità, interferenza endocrina).

Risultati preliminari

Il FET test ha permesso di osservare gli effetti acuti del PFOA rilevando la presenza di letalità in tutte le diverse concentrazioni considerate (Tabella 1); i risultati più significativi sono stati osservati alle due concentrazioni più elevate (100 e 500 mg/L; Tabella 1). Tuttavia, una mortalità del 20-25% è stata registrata anche alle concentrazioni più basse (Tabella 1). Parallelamente è stata osservata la presenza di alcuni effetti subletali (es. deformità embrionale, alterazione della frequenza e del flusso cardiaco, alterazione dell'attività locomotoria delle larve); tali effetti sono stati rilevati soprattutto alle più basse concentrazioni di PFOA. L'analisi degli effetti subletali è tuttora in corso.

Tabella 1. Letalità embrionale registrata a 96 ore dopo la fecondazione a seguito dell'esposizione a cinque diverse concentrazioni di PFOA. In grassetto sono stati evidenziati i valori più significativi.

Concentrazione di PFOA (mg/L)	Letalità a 96 ore
500	100%
100	40%
10	25%
1	20%
0.1	20%

Discussione e Conclusioni

L'analisi degli effetti del PFOA sullo sviluppo embrionale di *Danio rerio* ha evidenziato una mortalità in tutte le concentrazioni prese in esame, evidenziando una letalità totale nella concentrazione massima (500 mg/L). I risultati ottenuti finora sono in linea con quelli riscontrati in precedenti lavori che hanno investigato gli effetti del PFOA su tale organismo modello (Hagenaars et al., 2011; Ulhaq et al. 2013). Questi risultati supportano la validità degli embrioni di *Danio rerio* sia per lo *screening* di sostanze regolamentate che per quelle emergenti. Queste ultime possono determinare possibili conseguenze deleterie sulle comunità biotiche presenti negli ecosistemi (Cristiano et al., *Submitted*; Di Paolo et al., 2015).

I risultati preliminari, di questo studio potranno contribuire ad ampliare la conoscenza del meccanismo d'azione dei PFAS, nonché le conoscenze di base e quelle utili alla prevenzione nel monitoraggio ambientale. Infatti, grazie alla versatilità del FET e al recente sviluppo di software specifici dedicati all'analisi in contemporanea di video e immagini di diversi embrioni, sarà inoltre possibile osservare e quantificare con maggior dettaglio i parametri subletali di cardiotoxicità e neurotossicità. La tossicità acuta del PFOA è stata inoltre già precedentemente dimostrata anche in forma di miscela con altre sostanze del gruppo dei PFAS (PFOS, acido perfluorooctansolfonico; Ding et al., 2013).

I risultati di tale studio saranno infatti implementati con la valutazione degli effetti di altri PFAS rilevati negli ecosistemi acquatici (es. PFBA) sugli embrioni di *Danio rerio*,

prima separatamente e poi in miscela con il PFOA, fornendo conoscenze utili per l'aggiornamento degli SQA protettivi per l'ambiente e la salute umana.

In conclusione, come descritto in precedenza, gli SQA dei PFAS riguardano soltanto poche sostanze e pertanto ulteriori contributi si rendono necessari per identificarne e prevederne destino ambientale ed effetti. Risulta perciò evidente che un approccio ecotossicologico dovrebbe essere adottato in maniera sistematica anche in fase di definizione dello stato di salute dei corpi idrici. In questo modo si potrebbero individuare precocemente i possibili effetti sugli ecosistemi e adottare misure di prevenzione e di gestione utili alla riduzione del rischio per la salute umana

Bibliografia

Ahrens L, Bundschuh M 2014. Fate and effects of poly-and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review. *Environ Toxicol Chem* 33: 1921-1929.

Castiglioni S, Valsecchi S, Polesello S, Rusconi M, Melis M, Palmiotto M, Manenti A, Davoli E Zuccato E 2015. Sources and fate of perfluorinated compounds in the aqueous environment and in drinking water of a highly urbanized and industrialized area in Italy. *Journal of hazardous materials*, 282:51-60.

Cristiano W, Lacchetti I, Mancini L, Corti M, Di Domenico K, Di Paolo C, Hollert H, Carere M. Promoting zebrafish embryo tool to identify the effects of chemicals in the context of Water Framework Directive monitoring and assessment. *Submitted to Microchem J*.

D.Lgs 172/2015. Attuazione della direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque.

Di Paolo C., Seiler T.B., Keiter S., Hu M., Muz M., Brack W., Hollert H. The value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis - a review. *Environmental Sciences Europe*, 27:8

Ding G, Zhang J, Chen Y, Wang L, Wang M, Xiong D, Sun Y 2013. Combined effects of PFOS and PFOA on zebrafish [*Danio rerio*] embryos. *Arch Environ Con Tox*, 64: 668-675.

EFSA Opinion. Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. December 2018. *EFSA Journal* 2018;16(12):5194.

Giesy JP, Kannan K 2001. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ Sci Technol* 35:1339-1342.

Hagenaars A, Vergauwen L, De Coen W, Knapenab D 2011. Structure-activity relationship assessment of four perfluorinated chemicals using a prolonged zebrafish early life stage test. *Chemosphere*, 82:5 764-772.

Ingelido AM, Abballe A, Gemma S, Dellatte E, Iacovella N, De Angelis G, Zampaglioni F, Marra V, Miniero R, Valentini S Russo F 2018. Biomonitoring of perfluorinated compounds in adults exposed to contaminated drinking water in the Veneto Region, Italy. *Environment international*, 110:149-159.

Martin JW, Mabury SA, Solomon KR, Muir DCG 2003. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss*]. *Environ Toxicol Chem* 22:196-204.

Organisation for Economic Co-operation and Development 2013. Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, France.

Polesello S, Pagnotta R, Marziali L, Patrolecco L, Rusconi M, Stefani M, Valsecchi S 2013. Realizzazione di uno studio di valutazione del Rischio Ambientale e Sanitario associato alla contaminazione da sostanze perfluoro-alchiliche (PFAS) nel Bacino del Po e nei principali bacini fluviali italiani. Relazione finale. Relazione finale. Disponibile all'indirizzo:

http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/reach/progettoP_FAS_ottbbre2013.pdf.

Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol* 40:32–44.

Uhlaq M, Carlsson G, Örn S, Norrgren L 2013. Comparison of developmental toxicity of seven perfluoroalkyl acids to zebrafish embryos. *Environ Toxicol and Pharmacol*, 36:2 423-426.

Valsecchi S, Conti D, Crebelli R, Polesello S, Rusconi M, Mazzoni M, Preziosi E, Carere M, Lucentini L, Ferretti E, Balzamo S, Simeone MG, Aste F 2017. Deriving environmental quality standards for perfluorooctanoic acid (PFOA) and related short chain perfluorinated alkyl acids. *Journal of hazardous materials*, 323, 84-98.

VERSO LA VALIDAZIONE DEL TEST DEI MICRONUCLEI CON *TRADESCANTIA* PER IL MONITORAGGIO DELLA GENOTOSSICITÀ IN AMBIENTE ALPINO

by M. Casera^a, F. Lazzeri^b, L. Verdi^c

^a Laboratorio biologico provinciale (APPA Bolzano) – maddalena.casera@provincia.bz.it

^b Laboratorio biologico provinciale (APPA Bolzano) – francesca.lazzeri@provincia.bz.it

^c Laboratorio Analisi aria e radioprotezione (APPA Bolzano) – luca.verdi@provincia.bz.it

Abstract - La pianta appartenente al genere *Tradescantia*, di origine tropicale e quindi adattata a un clima con elevata umidità e temperatura, viene comunemente impiegata nel monitoraggio della genotossicità. In questo studio è stata verificata l'efficacia del test dei Micronuclei (MCN) con *Tradescantia* in condizioni climatiche estreme, come quelle continentali alpine in Alto Adige, caratterizzate da oscillazioni elevate dei valori di temperatura e umidità, ma anche da un elevato apporto di inquinanti derivanti dal traffico e dal riscaldamento domestico. Il monitoraggio è stato svolto dal 2011 al 2014. I risultati indicano che la validità del test con la pianta tropicale *Tradescantia* per il biomonitoraggio degli inquinanti genotossici in un clima alpino è notevolmente alterata, comportando una forte variabilità della frequenza di micronuclei e di conseguenza un'elevata deviazione standard. Una soluzione per l'impiego futuro di questo test potrebbe essere la quantificazione degli effetti dei fattori ambientali, come la temperatura e l'irraggiamento solare, sulla frequenza di MCN, per calibrare e standardizzare i risultati.

Keywords: *Tradescantia*, mutagenicità, inquinamento atmosferico, riscaldamento a legna

Introduzione

L'inquinamento dell'aria viene considerato dall'organizzazione mondiale della sanità (WHO) come uno dei principali fattori di esposizione che danneggiano la salute umana, causando malattie cardiovascolari e respiratorie croniche, oltre a comportare un aumento della instabilità genomica e dell'incidenza del cancro nell'uomo (Nyberg et al., 2000; Cheng, 2003; Bernstein et al., 2004; Cohen et al., 2004). Negli ambienti urbani l'aria contiene una grande varietà di sostanze chimiche potenzialmente cancerogene, inclusi gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), il benzene e l'arsenico, come risultato della combustione incompleta dei combustibili fossili, associati con il traffico veicolare, le attività industriali e il riscaldamento domestico (Mišik et al., 2006).

Da alcuni decenni sono state introdotte analisi che prevedono l'impiego di indicatori biologici e tra questi sono andati sempre maggiormente diffondendosi test che prevedono l'utilizzo di piante. La pianta del genere *Tradescantia* è considerata un ottimo indicatore dell'inquinamento atmosferico e degli effetti mutageni di miscele di sostanze aerodisperse, rappresentando uno dei modelli più promettenti per il

monitoraggio ambientale, come dimostrato da diversi studi a partire dagli anni '80 (Monarca et al., 2001; Klumpp et al., 2006). Se esposta direttamente all'aria aperta ha la capacità di assorbire attraverso i boccioli gli agenti atmosferici inquinanti e di modificare, in presenza di sostanze genotossiche e/o cancerogene, le cellule madri del suo polline. L'attività genotossica degli inquinanti aerei è facilmente evidenziabile come danno a carico del Dna all'interno delle cellule polliniche, visibile al microscopio sotto forma di frammenti tondeggianti di cromatina staccatisi dal nucleo, indicati come "micronuclei". Lo scopo del presente lavoro era di rilevare la presenza di effetti genotossici dovuti sia all'inquinamento atmosferico causato dall'utilizzo di legna come combustibile per il riscaldamento, e sia al traffico veicolare.

Materiali e metodi

La pianta utilizzata per il test di mutagenicità dei micronuclei appartiene alla famiglia delle *Commelinaceae*, al genere *Tradescantia* ed in particolare al clone # 4430, ottenuto dall'incrocio tra *T. hirsutiflora* e *T. subcaulis*. Per l'esecuzione dei test è stata seguita la metodica descritta da Ma et al., in "Tradescantia micronucleus bioassay" (1994). Le infiorescenze sono state esposte per 24 ore. Solo nel mese di dicembre 2012 le infiorescenze sono state esposte per sole 6 ore a causa delle temperature molto basse. Al microscopio ottico si è quindi proceduto al conteggio delle tetradi precoci prive di micronuclei e di quelle con micronuclei. La frequenza dei micronuclei (MCN) è stata espressa come MCN/100 tetradi. In parallelo alle analisi di mutagenicità, il Laboratorio di Analisi Aria e radioprotezione ha misurato la concentrazione di diversi parametri chimico fisici, tra cui la temperatura, l'irraggiamento solare, gli NOX, il particolato atmosferico (PM10 e PM2,5). I risultati sono stati elaborati mediante analisi statistica della varianza (Anova univariata) seguita dal test t di Dunnett; inoltre i dati di mutagenesi e quelli chimico-fisici sono stati confrontati mediante la correlazione di Pearson. Nell'ambito del territorio della Provincia di Bolzano sono state individuate sei stazioni di campionamento, dislocate in diversi centri urbani, rurali e lungo l'Autostrada del Brennero (A22). I campionamenti sono stati eseguiti 5 volte nel periodo compreso tra giugno 2011 e giugno 2014, con 2 campionamenti nell'anno 2012, uno in aprile e l'altro in dicembre.

Risultati

Nella tabella 1 sono indicate le frequenze di micronuclei nelle sei stazioni nei diversi periodi di campionamento, mentre le tabelle 2 e 3 mostrano i valori medi del monitoraggio degli NOX, delle PM10 e PM2,5, della temperatura e dell'irraggiamento solare rispettivamente per le stazioni di Bolzano (BZ5), Cortina all'Adige (CR1), Merano (ME1) e di Laces (LA1), Chiusa (AB1), Vipiteno (ST1). Mediante l'analisi della varianza i valori di mutagenicità rilevati nei siti di Chiusa (AB1) in giugno 2011, aprile 2012 e aprile 2013 sono risultati significativamente differenti rispetto al controllo. Una differenza significativa è stata riscontrata anche tra la frequenza di micronuclei del controllo e dei siti di Vipiteno (ST1) in aprile e dicembre 2012 e in aprile 2013, e di Laces (LA1) in giugno 2014.

A causa della variabilità relativamente elevata dei dati di mutagenesi, come indicato dai valori delle deviazioni standard, non sono state registrate altre differenze statisticamente significative.

Il confronto mediante la correlazione di Pearson dei dati relativi alle frequenze di micronuclei con i valori chimico-fisici ha rilevato la presenza di una correlazione significativa negativa con la temperatura (coefficiente di correlazione = -0,613, P = 0,01) e con l'irraggiamento solare (coefficiente di correlazione = -0,478, P = 0,05).

Tabella 1. Risultati test di mutagenicità

	Trad-MCN/100 tetradi (Media ± S.D.)				
Codice Campione	Giugno 2011	Aprile 2012	Dicembre 2012	Aprile 2013	Giugno 2014
BZ 5 Bolzano	4,1 ± 0,85	5,2 ± 2,0	-	4,9 ± 3,1	-
AB 1 Chiusa	7,1 ± 3,2**	7,7 ± 1,6*	7,4 ± 2,6	5,1 ± 0,6**	5,7 ± 1,8
ST 1 Vipiteno	4,7 ± 1,7	8,1 ± 1,8*	16,0 ± 4,2**	7,8 ± 3,3*	4,1 ± 2,0
CR 1 Cortina	4,4 ± 1,5	2,9 ± 0,3	-	2,3 ± 0,7	-
ME 1 Merano	3,2 ± 1,2	3,3 ± 1,5	-	4,6 ± 2,2	-
LA 1 Laces	3,4 ± 1,4	4,2 ± 1,2	7,7 ± 3,4	5,4 ± 1,5	8,7 ± 3,2**
Controllo	2,6 ± 1,0	4,3 ± 0,7	5,4 ± 3,9	2,1 ± 0,4	2,2 ± 1,3

* = $P < 0.05$ (livello 5%) statisticamente significativo in accordo con il Dunnett's t-test

** = $P < 0.01$ (livello 1%) statisticamente molto significativo in accordo con il Dunnett's t-test

Tabella 2. Risultati analisi chimiche per le stazioni di Bolzano (BZ5), Cortina all'Adige (CR1), Merano (ME1)

Codice	Parametro		21/06/2011	18/04/2011	22/04/2011
			1	2	3
BZ 5	NOX	µg/m ³	51,6	68,8	68,8
	Temp	°C	24,5	17,9	14,6
	RAD	W/m	49464	33264	29854
	PM10	µg/m ³	23,4	9,8	11,9
	PM2.5	µg/m ³	18	8,9	8,9
CR 1	NOX	µg/m ³	16,8	25	49,5
	Temp	°C	23,9	10,7	13
	RAD	W/m	40008	22422	15920
	PM10	µg/m ³	21,9	4,4	11,7
	PM2.5	µg/m ³	14,9	4,8	11,8
ME 1	NOX	µg/m ³	32,5	92,2	53
	Temp	°C	23	16,2	14,5
	RAD	W/m	37516	39890	20929
	PM10	µg/m ³	19,4	12,9	16
	PM2.5	µg/m ³	15,8	8,2	13,7

Tabella 3. Risultati analisi chimiche per le stazioni di Laces (LA1), Chiusa (AB1), Vipiteno (ST1)

Codice camp.	Parametro		21/06/11	18/04/12	06/11/12	05/12/12	22/04/13	03/06/14
LA 1	NOX	ug/m ³	18,	25,	17,	-	22,	17,
	Temp	°C	20,	14,	7,3	-	12,	16,
	RAD	W/m ²	498	434	877	-	221	355
	PM10	ug/m ³	12,	9,2	5	-	16,	6,6
	PM2.5	ug/m ³	12,	8,8	2,5	-	15,	8,1
AB 1	NOX	ug/m ³	116	141	-	552	141	126
	Temp	°C	22,	8,7	-	0,3	12	15,
	RAD	W/m ²	534	276	-	589	214	323
	PM10	ug/m ³	21,	10,	-	34,	17,	8,9
	PM2.5	ug/m ³	17,	7,8	-	20,	14,	9,1
ST 1	NOX	ug/m ³	41	39,	-	105	29	38
	Temp	°C	19,	5	-	-0,2	9,7	13,
	RAD	W/m ²	347	150	-	542	196	327
	PM10	ug/m ³	15,	7,9	-	17,	11,	8,6

Discussione

I risultati del presente studio hanno evidenziato la presenza di una più elevata concentrazione di micronuclei nelle infiorescenze di *Tradescantia* esposte soprattutto nei siti localizzati dove il traffico veicolare risulta molto intenso in prossimità dell'autostrada del Brennero, come a Chiusa e Vipiteno. La particolare conformazione della vallata molto stretta, in cui corre l'asse autostradale, determina soprattutto in presenza di temperature più basse, un aumento della concentrazione degli inquinanti atmosferici e anche della frequenza di MCN.

Non sempre però è stato possibile svolgere dei test nei mesi invernali, poiché trattandosi di una pianta di origine tropicale non si è ben adattata alle basse temperature tipiche della zona alpina. I valori medi dei controlli tenuti in laboratorio hanno mostrato inoltre un discreto aumento nei mesi più freddi, impedendo così di individuare una differenza statisticamente significativa con i campioni, come ad esempio quelli localizzati a Chiusa e Laces, che mostrano in particolare in dicembre 2012, quando i valori di NOX e PM10 sono più alti, valori di MCN piuttosto elevati.

Conclusioni

L'applicazione di test biologici come il monitoraggio in situ mediante la pianta *Tradescantia* permette di acquisire delle informazioni integrative sull'effetto delle miscele complesse degli inquinanti sugli organismi viventi, fornendo importanti

indicazioni sul potenziale genotossico di queste miscele e sui maggiori rischi alla salute ad essi associati, a cui possono essere sottoposti gli abitanti ad esse esposte. I siti indagati soggetti a maggiore traffico veicolare hanno mostrato un aumento della frequenza di micronuclei, ma questi danni cromosomici non possono essere imputati solo agli inquinanti atmosferici misurati. Anche le condizioni atmosferiche più rigide, come le basse temperature, hanno influito negativamente sulla formazione di micronuclei. Per poter utilizzare il Trad-MCN test in programmi di monitoraggio routinario sarebbe quindi necessaria una maggiore standardizzazione della tecnica di esposizione, in particolare nei periodi più freddi, allo scopo di ridurre la variabilità dei risultati causata dal variare delle condizioni ambientali. Una soluzione per l'impiego futuro di questo test potrebbe essere la quantificazione degli effetti dei fattori ambientali, come la temperatura e l'irraggiamento solare, sulla frequenza di MCN, per calibrare e standardizzare i risultati.

Ringraziamenti

Si ringrazia il personale della giardiniera dell'Azienda Laimburg che ci ha coltivato le piante di *Tradescantia*, il personale del laboratorio Analisi Aria e radioprotezione e del Laboratorio biologico dell'Agenzia per l'ambiente, che ha collaborato alla realizzazione di questa ricerca.

Bibliografia

- Bernstein J.A., Alexis N., Barnes C., Bernstein I.L., Nel A., Peden D., Diaz-Sanchez D., Tarlo S.M., Williams P.B., 2004. Health effects of air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1116-1123.
- Cohen A.J., Anderson H.R., Ostro B., Pandey K.D., Krzyzanowski M., Kuenzli N., Gutschmidt K., Pope C.A., Romieu I., Samet J.M., Smith K.R., 2004. Mortality impacts of urban air pollution, in: Ezzati M., Rodgers A.D., Lopez A.D., Murray C.J.L. (Eds.), *Comparative Quantification of Health Risks: Global and Regional Burden of Disease due to Selected Major Risk Factors*, vols. 2 of 3, World Health Organization, Geneva, pp. 1353-1433.
- Cheng Y.W. 2003. Environmental exposure and lung cancer among nonsmokers: an example of Taiwanese female lung cancer. *J Environ. Sci. Health C21*, 1-28.
- Klumpp A., Ansel W., Klumpp G., Calatayud V., Garrec J.P., He S., Peñuelas J., Ribas À., Ro-Poulsen H., Rasmussen S., Sanz M.J., Vergne P., 2006. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. *Environ. Pollut.* 139, 515-522.
- Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vandenberg A.L., Salamone M.F., 1994. *Tradescantia* micronucleus bioassay – *Mutation research* 310: 221-230.
- Mišik M., Solenská M., Mičieta K., Mišíková K., Knasmüller S., 2006. In situ biomonitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays. *Mutat. Res.* 605, 1-6.
- Monarca S., Feretti D., Zanardini A., Moretti M., Villarini M., Spiegelhalter B., Zerbini I., Gelatti U., Lebbolo E., 2001. Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. *Mutation Research* 490, 159-169.
- Nyberg F., Gustavsson P., Jarup L., Bellander T., Berglind N., Jakobsson R., Pershagen G., 2000. Urban air pollution and lung cancer in Stockholm. *Epidemiology* 11, 487-495.

APPLICAZIONE DI TEST ECOTOSSICOLOGICI SU ACQUE POTABILI

by F. Lazzeri^a, M. Casera^b

^a Laboratorio biologico provinciale (APPA Bolzano) – francesca.lazzeri@provincia.bz.it

^b Laboratorio biologico provinciale (APPA Bolzano) – maddalena.casera@provincia.bz.it

Abstract - Nell'ambito di un'indagine esplorativa finalizzata ad ottimizzare la tipologia di analisi da effettuarsi in casi di emergenza idropotabile, le analisi ecotossicologiche sono state affiancate alle analisi microbiologiche e chimiche di routine, sebbene non siano previste dalla legislazione vigente. Dal dicembre 2017 al gennaio 2018 sono stati eseguiti il test acuto con *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* su 90 campioni di acqua potabile non clorata, provenienti da serbatoi e acquedotti di diversi comuni della Provincia autonoma di Bolzano. I risultati dei test ecotossicologici sono stati confrontati con i risultati delle analisi chimiche, in particolare con i valori di conducibilità elettrica, pH, metalli pesanti, fluoruri e solfati, antiparassitari e idrocarburi. La tossicità registrata per alcuni campioni sembra essere correlata ad una bassa conducibilità elettrica e ad una maggiore concentrazione di metalli quali Zn, Fe, Mn, attribuibile con grande probabilità a fenomeni di corrosione di tubature obsolete. Questo studio ha dimostrato come le analisi ecotossicologiche siano in grado di evidenziare criticità non segnalate dai parametri microbiologici e chimici, in quanto quest' ultimi ampiamente entro i limiti previsti dal Decreto legislativo n. 31 del 2001.

Keywords: ecotossicologia, acque potabili, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, analisi chimiche

Introduzione

Nell'ambito di un'indagine esplorativa finalizzata ad ottimizzare la tipologia di analisi da effettuarsi in casi di emergenza idropotabile, le analisi ecotossicologiche sono state affiancate alle analisi microbiologiche e chimiche di routine, sebbene non siano previste dalla legislazione vigente. Dal dicembre 2017 al gennaio 2018 sono stati eseguiti il test acuto con *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* su circa 90 campioni di acqua potabile non clorata, provenienti da serbatoi e acquedotti di diversi comuni della Provincia autonoma di Bolzano. I risultati dei test ecotossicologici sono stati confrontati con i risultati delle analisi chimiche, in particolare con i valori di conducibilità elettrica, durezza, pH, metalli pesanti, fluoruri, solfati, antiparassitari, fitofarmaci, triometani e idrocarburi allo scopo di verificare l'utilità delle analisi ecotossicologiche.

Materiali e metodi

I 90 campioni di acqua potabile non clorata sono stati prelevati da serbatoi e acquedotti di diversi comuni della Provincia autonoma di Bolzano dai tecnici della prevenzione del Servizio igiene dell'Azienda Sanitaria dell'Alto Adige secondo i protocolli previsti dalla normativa vigente, conservati a +4 C° e consegnati al Laboratorio biologico provinciale e al Laboratorio analisi acque e cromatografia per l'esecuzione rispettivamente delle analisi ecotossicologiche, microbiologiche e chimiche.

Tabella 1. Test ecotossicologici eseguiti

Organismo	Matrice	Durata	Metodo	End point
<i>Daphnia magna</i>	Acqua	24h	Acuto UNI EN ISO 6341/2013	Immobilizzazione
<i>Vibrio fischeri</i>	Acqua	15'	ComparisonTest Microtox	Inibizione bioluminescenza

Tabella 2. Analisi chimiche e microbiologiche eseguite

Parametri chimici e micrrobiologici
Secondo quanto previsto dagli allegati I e II del Decreto legislativo n. 31 del 2001

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). Poiché per le acque potabili non sono previste per legge le analisi ecotossicologiche e pertanto non esistono valori limite sui quali basare una conformità, sono stati "segnalati" tutti quei campioni che hanno presentato un'inibizione/immobilizzazione $\geq 5\%$. Per i parametri chimici e microbiologici valgono i limiti previsti dal Decreto legislativo n. 31 del 2001 e successive modifiche ed integrazioni.

Risultati

Il Laboratorio provinciale analisi acqua e cromatografia ha analizzato 55 tra parametri chimici e fisici. Per nessuno dei 90 campioni esaminati sono stati superati i limiti previsti dalla normativa vigente.

Per quanto riguarda i parametri microbiologici, anche in questo caso, nessun campione esaminato ha superato i limiti previsti per legge.

Per quanto riguarda le analisi ecotossicologiche su 90 campioni analizzati, 18 hanno dato tossicità per il parametro *Daphnia magna*, nessuno per *Vibrio fischeri*, per il quale è stata rilevata sempre ormesi. In Tabella 3 e 4 sono riportati i risultati delle analisi ecotossicologiche e di alcuni dei parametri chimici più significativi relativi a questi 18 campioni.

Tabella 3.

Cod. punto	Conducibilità elettr. spec.	pH	Durezza totale °F	Alcalinità mg/L	Solfati mg/L	Daphnia % immobil.	Vibrio % inibizione
RO2	132	7.5	6	42	29	10	-1.808
RO4	222	7.9	14	162	5	5	-9.837
RO1	339	7.9	20	165	66	10	-13.37
E07	60	7.4	3	28	7	35	-15.02
RO1	280	7.9	16	123	57	45	-26.32
E05	130	7.6	6	45	25	45	-26.47
Scuola	92	7.2	5	54	5	35	-16.9
RO1	176	6.5	9	13	78	15	-10.43
E28	188	7.9	9	18	83	60	-14.25
E05	215	7.7	13	129	23	60	-13.34
RO1	638	7.4	42	269	190	5	-14.66
HB	76	7.5	4	39	7	5	-31.96
E01	277	7.8	19	170	41	5	-21.68
E04	52	7	3	27	7	100	-4.672
E12	92	8	6	55	7	40	-21.68
RO2	63	7.4	3	31	7	5	-3.969
Q06	285	7.7	16	131	58	5	-21.26
Q05	259	7.9	14	115	50	10	-16.63

Tabella 4.

Cod. punto	Al µg/L	Ni µg/L	Zn µg/L	As µg/L	Fe µg/L	Mn µg/L	Daphnia % immobil.	Vibrio % inibizione
RO2	<4	<1.0	2.4	2.1	<10	<2	10	-1.808
RO4	<4	<1.0	<1.0	<1.0	<10	<2	5	-9.837
RO1	<4	<1.0	3.6	<1.0	<10	<2	10	-13.37
E07	5	<1.0	178	<1.0	41	8	35	-15.02
RO1	6	<1.0	<1.0	2.1	<10	<2	45	-26.32
E05	<4	<1.0	1.6	7.3	<10	<2	45	-26.47
Scuola	<4	<1.0	68	<1.0	22	<2	35	-16.9
RO1	32	4.9	11.1	2.8	<10	<2	15	-10.43
E28	<4	4.8	8.3	<1.0	13	<2	60	-14.25
E05	<4	<1.0	29	<1.0	<10	<2	60	-13.34
RO1	<4	<1.0	<1.0	2.4	<10	<2	5	-14.66
HB	5	<1.0	7	<1.0	<10	<2	5	-31.96
E01	<4	<1.0	<1.0	<1.0	<10	<2	5	-21.68
E04	<4	<1.0	47	<1.0	84	4	100	-4.672
E12	5	<1.0	10.8	5.4	<10	<2	40	-21.68
RO2	<4	<1.0	3.9	<1.0	<10	<2	5	-3.969
Q06							5	-21.26
Q05							10	-16.63

Discussione

Per comprendere le cause della mortalità di *Daphnia magna*, i risultati dei test ecotossicologici sono stati confrontati con i risultati delle analisi chimiche, in particolare con i valori di conducibilità elettrica, durezza, pH, metalli pesanti, fluoruri e solfati, antiparassitari e idrocarburi. In alcuni dei casi in cui si è avuta mortalità si sono riscontrate concentrazioni maggiori di Zn, Fe e Mn e una bassa conducibilità elettrica (spesso < 100 µS/cm), sebbene nessuno di questi parametri abbia dato valori al di fuori dei limiti previsti per legge. I valori di pH rientrano tutti nel range di sopravvivenza per entrambi gli organismi, mentre la durezza è risultata spesso bassa. Considerando che, secondo quanto previsto dai Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* (8020) indicati nei Rapporti Apat 29/2003, l'acqua di allevamento deve avere una durezza di circa 150 mg CaCO₃/L e che nei casi in cui si è avuta mortalità, l'acqua presentava quasi sempre valori inferiori, questo potrebbe considerarsi un fattore limitante per la sopravvivenza dell'organismo *Daphnia magna*. Acque molto dolci (<10° F) possono inoltre provocare effetti di corrosione e un'acqua con bassa conducibilità elettrica può favorire la formazione di ruggine, in caso di tubazioni metalliche. In presenza di sufficiente alcalinità, il calcio inibisce la corrosione. Maggiore è l'alcalinità, minore è l'aggressività dell'acqua (Buzzanca et al., 1994). Nessun effetto tossico è infine attribuibile a parametri quali triometani, benzene, antiparassitari, fitofarmaci, metanolo, glicol etilenico e glicol propilenico, in quanto i risultati delle analisi hanno dato valori assenti o abbondantemente al di sotto dei limiti vigenti.

Conclusioni

- La tossicità registrata per alcuni campioni sembra essere correlata ad una bassa conducibilità elettrica e durezza e ad una maggiore concentrazione di metalli quali Zn, Fe e Mn attribuibile con grande probabilità a fenomeni di corrosione di tubature obsolete.
- I valori di durezza < a 150 mg CaCO₃/L possono aver costituito un fattore limitante per la sopravvivenza di *Daphnia magna*.
- La normativa vigente non prevede l'esecuzione delle analisi ecotossicologiche sulle acque potabili. I risultati di questo studio dimostrano però, che in casi di emergenza idropotabile, le analisi ecotossicologiche possono evidenziare criticità non segnalate dai parametri microbiologici e chimici, in quanto questi ultimi ampiamente entro i limiti previsti dal Decreto legislativo n. 31 del 2001.

Ringraziamenti

Si ringrazia il personale del Laboratorio analisi acque e cromatografia dell'Agenzia per l'ambiente per la collaborazione.

Bibliografia

Buzzanca G, Quaglia G.M, Torri L, 1994. Il fenomeno della corrosione dei materiali metallici utilizzati nelle reti acquedottistiche. *Biologia ambientale* 6/1994: 5-10.
D.L. 2 febbraio 2001, n. 31 "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano".

ISO 11348-3: 1998 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.

APAT - Metodi analitici per le acque, Volume Terzo, Sezione 8020: Metodi di valutazione della tossicità con Daphnia. Manuali e linee guida 29/2003.

UNI EN ISO 6341: 2013 Determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) Prova di tossicità acuta.

L'UTILITÀ DELL'APPROCCIO ECOTOSSICOLOGICO A TUTELA DELLA SALUTE DEL BAGNANTE

by R. De Angelis

Ispra - roberta.deangelis@isprambiente.it

Abstract

I cambiamenti nelle condizioni degli ecosistemi e delle dinamiche socio-demografiche hanno contribuito a determinare una nuova situazione che ha favorito la comparsa di patologie idrodifuse causate da patogeni emergenti e tossine naturali. Gli enti preposti al controllo ambientale e sanitario sono sempre più impegnati nella gestione di emergenze ambientali, che richiedono la valutazione di pericoli per la salute pubblica. Pertanto, è opportuno definire una strategia condivisa sui temi "Ambiente & Salute", un settore in cui è necessario elaborare una visione sempre più integrata e strategica. Nel presente lavoro viene valutata, sulla base della bibliografia disponibile, la possibilità di inserire le indagini ecotossicologiche nella valutazione della balneabilità di un'acqua. Infatti, la direttiva europea 2006/7/CE prescrive che, per la tutela del bagnante, vengano presi in considerazione tutti i rischi anche potenziali. Perciò è necessario procedere sia all'identificazione del rischio sia alla sua caratterizzazione, attraverso metodiche affidabili e con significativa rilevanza. In particolare, i saggi ecotossicologici risultano uno strumento efficace, perché fornendo informazioni sul significato biologico della contaminazione (biotica o abiotica), consentirebbero di stabilire dei valori limite a cui associare un effetto, evitando così numerosi divieti di balneazione emessi a scopo precauzionale, con ricadute sul settore socio-economico.

Keywords: cianotossine, acque di balneazione, microcistina, saggi ecotossicologici.

Introduzione

Negli ultimi anni, a causa di diversi fattori (cambiamenti climatici e attività antropiche), si è osservato un aumento delle fioriture algali in corpi idrici destinati anche alla balneazione. In particolare, alcuni fattori ambientali (temperatura, intensità luminosa, radiazione ultravioletta, vento, pH, nutrienti, salinità...) influenzano significativamente il tasso di crescita di queste alghe e, nel caso di specie potenzialmente tossiche, la produzione delle tossine (Boopathi T. , 2014). Tra queste è presente il gruppo delle cianotossine, metaboliti secondari, prodotti da vari generi di cianobatteri, con effetti tossici per la maggior parte degli eucarioti, compreso l'uomo (intossicazioni e reazioni cutanee). Quest'ultimo, attraverso l'uso ricreativo delle acque, può essere esposto alle tossine per via orale, cutanea ed inalatoria. Le cianotossine più comuni e maggiormente studiate sono le microcistine. La tossicità della famiglia dei congeneri della microcistina ha ricevuto molta attenzione nei modelli animali e cellulari; tuttavia, si hanno meno conoscenze riguardo gli effetti negativi sulla salute umana. La normativa per la gestione della qualità delle acque di balneazione (DLgs 116/2008, D.M. Salute 30 Marzo e D.M. Salute 19 aprile 2018) prevede un piano di sorveglianza per le fioriture algali, volto alla tutela del bagnante ma anche all'adozione di misure per il miglioramento ambientale. Obiettivo raggiungibile attraverso una

gestione che preveda un approccio multidisciplinare, in cui l'ecotossicologia potrebbe aiutare a capire il potenziale di tossicità di una data fioritura algale.

Materiali e metodi

I dati riportati nel presente elaborato si riferiscono ai risultati del monitoraggio effettuato durante la stagione balneare 2017 dalle APPA/ARPA e ATS-Brescia, ATS-Bergamo, ATS-Montagna, ATS Brianza territorialmente competenti nelle acque di balneazione dei seguenti laghi: Caldaro (Bolzano), Fié (Bolzano) Lago Maggiore, Lago di Mergozzo, Lago d'Isèo, Lago di Endine, Lago di Como, Lago di Busiano, Lago di Garlate, Lago Moro, Lago di Piano, Lago di Lugano, Lago di Mezzola, Lago Caldonazzo, Lago D'Idro, Lago di Garda, Lago di Ledro, Lago di Levico, Lago di Serrai, Lago di Fiastra, Lago di Borgiano, Lago di Castreccioni e Lago Trasimeno. La frequenza dei generi e specie più ricorrenti è stata valutata considerando il genere e la specie che fossero presenti almeno in tre laghi considerati (Fig. 1). Di ciascun genere potenzialmente tossico è stata considerata la principale tossina prodotta e il tipo di tossicità. (Tabella 1).

Sulla base di queste ultime informazioni, attraverso un'analisi bibliografica, sono stati evidenziati i saggi con maggiore significatività per ciascuna tossina.

Risultati

La figura 1 riporta la presenza delle diverse specie di cianobatteri nei laghi balneabili italiani, rilevata con il monitoraggio effettuato durante la stagione balneare 2017. Mentre in tabella 1 sono riportati i generi algali e la potenziale tossina o tossine prodotte. Si può osservare che alcune specie potenzialmente tossiche sono particolarmente ricorrenti nel periodo della balneazione. Tra i generi più presenti ci sono i generi *Aphanocapsa*, *Dolicospermum*, *Microcystis*, *Planktothrix*, e *Pseudoanabaena*, tutti potenziali produttori di microcistine, a conferma che questo tipo di cianotossina è la più diffusa nelle acque, anche grazie alla sua struttura chimica che le conferisce una certa resistenza alla degradazione.

Purtroppo, l'analisi della letteratura esistente ha evidenziato una carenza di studi in cui si applicano i saggi ecotossicologici per valutare l'effetto delle cianotossine.

Ciononostante, se ne riportano alcuni, in cui si mostra la diversa risposta dell'organismo test al tipo di tossina saggiata.

In uno studio, (Zuccarello P. et al. 2016), eseguito su cianobatteri campionati nel Lago di Pozzillo in Sicilia è stata valutata la tossicità della microcistina (<1µg/L) su *Vibrio fischeri*, *Artemia salina* *Pseudokirchneriella sub capitata*, i risultati evidenziano che: il saggio algale di tossicità cronica con *Pseudokirchneriella sub-capitata* si è rivelato molto sensibile già a concentrazioni di 0,05 µg/L di tossina. Un secondo studio, condotto su acque lacustri e costiere polacche, (Bartoszewicz M. et al. 2004), in cui concentrazioni di microcistina rispettivamente pari a 6.9 µg/l, 19.55 µg/l, 3.9 µg/l e nodularina pari a 400 µg/l, testate su *Thamnocephalus platyurus*, *Artemia fransiscana*, indicano che tali specie sono sufficientemente sensibili, in termini di mortalità, solo a concentrazioni di tossina troppo elevate per poter essere considerate in ambito di sicurezza balneare. In un altro studio condotto in acque interne colombiane, (Herrera N.A. et al., 2015), gli organismi test *Moina micrura*, *Daphnia laevis*, *Daphnia similis* sono stati saggiati con 261 µg/g microcistina-LR; i risultati mostrano, nel caso della *Daphnia*, un' 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.), riassumibile con un'elevata tossicità.

In un lavoro condotto in acque del sudest polacco, (Sieroslawska A., et al. 2009), diverse concentrazioni di anatosina-a da estratto schiuma sono state utilizzate per test di tossicità acuta su *Daphnia pulex* e *Tetrahymena thermophila*, che hanno mostrato un'elevata tossicità dell'anatosina-a nell'ambiente acquatico (schiuma), rafforzando la necessità di monitorare lo sviluppo dei cianobatteri e la produzione di cianotossine. Infine, uno studio condotto su *Daphnia similis* e *Daphnia pulex*, (Ferraio-Filho et al. 2014), con diverse concentrazioni di microcistina e saxitossina, è stato osservato che i parametri di sopravvivenza e di nuoto sono fortemente influenzati in presenza di saxitossina.

In generale, il manuale USEPA (2002) per i test di tossicità acuta indica come idonei gli organismi di acqua dolce: *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia pulex* e *D. magna*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*.

Da questi risultati preliminari è desumibile una risposta da questa tipologia di saggi, pertanto sarebbe auspicabile, per il futuro, un maggiore applicazione di questa metodica nella valutazione della tossicità da fioriture algali, soprattutto se queste si verificano in corpi idrici utilizzati dall'uomo.

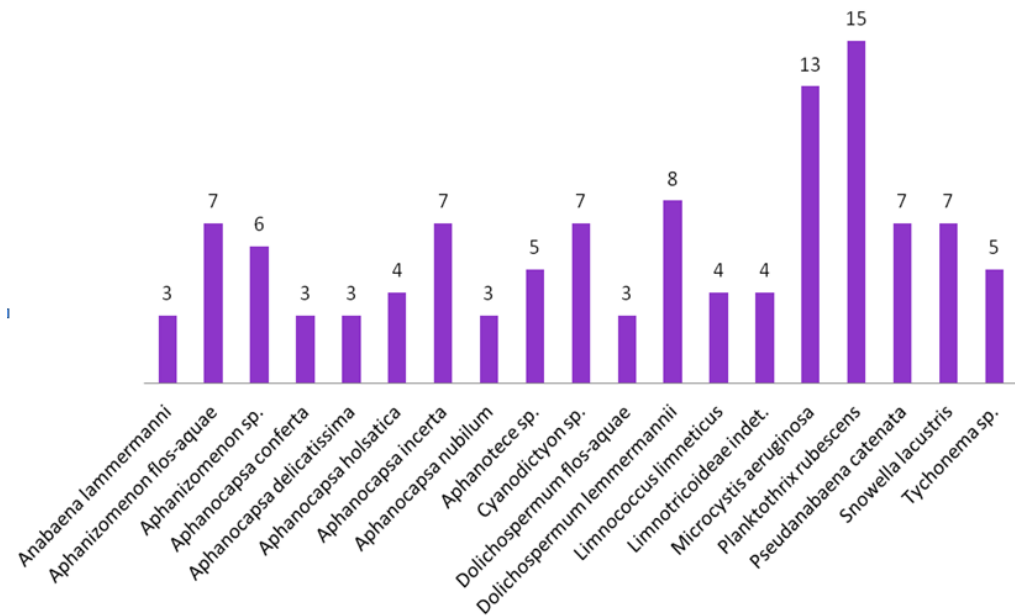


Figura 1. Frequenza dei generi e specie più ricorrenti nei laghi balneabili considerati

Tabella 1. Generi algali e potenziale cianotossina prodotta

Gruppo	Tossina	Generi
Epatotossina	Microcistine	<i>Microcystis, Planktothrix, Aphanizomenon, Dolichospermum (ex Anabaena), Anabaenopsis, Aphanocapsa, Hapalosiphon, Limnatrix, Nostoc ed Oscillatoria</i>
	Nodularine	<i>Nodularia</i>
Neurotossine	Anatossina -a	<i>Dolichospermum (ex Anabaena), Planktothrix, Aphanizomenon, Cyndrospermum, Oscillatoria, Phormidium, Raphidiopsis</i>
	Anatossina -a(s)	<i>Dolichospermum (ex Anabaena)</i>
	Saxitossine	<i>Dolichospermum (ex Anabaena), Planktothrix, Aphanizomenon, Cyndrospermopsis, Lyngbya</i>
Dermatotossine Citossine	Cilidrospermopsine	<i>Aphanizomenon, Cyndrospermopsis, Raphidiopsis, Umezakia</i>
	Lyngbyatossina-a	<i>Lyngbya, Oscillatoria, Schizothrix</i>
	Aplysiatossina e Debromoaplysiatossina	<i>Lyngbya, Oscillatoria, Schizothrix</i>

Discussione

Al fine di tutelare la salute del bagnante, a partire dalla stagione balneare 2010, la gestione delle proliferazioni cianobatteriche è stata eseguita secondo quanto riportato nell'allegato B del Decreto del Ministero della Salute 30 marzo. In particolare, con le nuove linee guida, in vigore a partire dalla stagione balneare 2019, la gestione delle fioriture da cianobatteri prevede più fasi: in particolare nella fase di routine è valutata la densità dei cianobatteri totali e, solo nella fase di allerta, è prevista l'identificazione della specie responsabile ed eventualmente la quantificazione della tossina. Pertanto, nella fase di routine non è noto l'eventuale potenziale tossico, se presente; contrariamente l'applicazione dell'analisi ecotossicologica ad una abbondanza di cianobatteri totali, consentirebbe di valutarne il potenziale tossico imputabile alla specie dominante. Applicando invece questa disciplina nella fase di allerta, si potrebbe capire se in presenza di specie tossica venga rilasciata la tossina, ancor prima di quantificarla. Quest'ultima indagine, peraltro, viene eseguita solo in pochi laboratori specializzati. Purtroppo, dall'analisi della letteratura non emergono ancora molti studi per poter definire una precisa procedura operativa. Tuttavia, sulla base di studi preliminari, è possibile riconoscere in questa metodica uno strumento utile per fornire informazioni sugli effetti della tossicità delle cianotossine su organismi test, da poter utilizzare correlare ad un modello di valutazione di rischio sanitario. Un'ulteriore utilità ne potrebbe derivare per lo studio dell'eventuale tossicità di schiume ancor prima di conoscerne la natura.

Conclusioni

Il dato che emerge da questo studio preliminare, dimostra che ci sono ancora molte carenze conoscitive che impediscono la definizione completa dei possibili scenari di esposizione e, quindi, la possibilità di condurre un'adeguata valutazione del rischio legato alle cianotossine. Relativamente alle specie test da utilizzare, ad oggi è

possibile affermare che, i cladoceri del genere *Daphnia* sembrano quelli maggiormente sensibili alle microcistine, con particolare riferimento alla MC-LR, quali 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, in via del tutto preliminare e da confermare, 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. Mentre per effettuare test anche sui solidi sospesi, è consigliato il saggio con *Vibrio fischeri* 15/30 min. Questi risultati sono molto preliminari, poiché supportati da pochi dati in letteratura, quindi sarebbe auspicabile per il futuro, un'attività di sperimentazione utile alla stesura di protocolli operativi e alla formulazione di batterie sito specifiche. Tale attività richiederà un coordinamento a vari livelli per la raccolta delle informazioni, l'organizzazione degli inter-confronti, l'elaborazione e interpretazione dei dati.

Ringraziamenti

Si ringraziano ARPA Piemonte, APPA Trento, APPA Bolzano, ARPA Veneto, ARPA Umbria ARPA Lazio, ARPA Marche, ARPA Friuli Venezia Giulia ARPA Lombardia (Regione Lombardia e ATS-Brescia, ATS-Bergamo, ATS-Montagna, ATS Brianza) per la collaborazione e la disponibilità dei dati di monitoraggio.

Bibliografia

EPA 202. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.

Bartoszewicz M., Mazur-Marzec H., Michalska M., Koboz J. 2004. Ecotoxicological testing in the studies on the toxicity of cyanobacterial blooms. <http://www.microbiotests.be/posters/cyanobacteria%20poster.pdf>

Sieroslawaska A., Rymusza A., Kalinowska R., Skowronski T., Bownik A., Pawlik-Skowronska (2009). Toxicity of cyanobacterial bloom in the eutrophic dam reservoir (Southeast Poland). *Environmental Toxicology and Chemistry*.

Herrera N. A., Palacio J., Echeverri L. F., Ferrao-Filho A. S., 2014. Effect of *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* [Cladocera]. 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.

Zuccarello P, Oliveri Conti G, Ledda C, Cristaldi A, BrundoMV, 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.

Decreto del Ministero della Salute del 19 aprile 2018 che modifica il decreto del 30 marzo 2010, recante: " Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n.116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione

APPLICAZIONE DEL PROTOCOLLO ANALITICO PER LA CARATTERIZZAZIONE ECOTOSSICOLOGICA E CHIMICA DEI SEDIMENTI (PRATO) DELL'INVASO DELLA VALGROSINA

Cristina Borlandelli^a, Erika Lorenzi^b, Pietro Genoni^c, Licia Guzzella^a, Laura Marziali^a, Clara Bravi^a

^a ARPA Lombardia, Settore Monitoraggi Ambientali, Via Ippolito Rosellini, 17 20124 MILANO - c.borlandelli@arpalombardia.it

^b CNR-IRSA, Istituto di Ricerca Sulle Acque, S.S. Brugherio, Via del Mulino, 19, I-20861 Brugherio, MB - marziali@irsa.cnr.it

^c Regione Lombardia - DG Enti locali, Montagna e Piccoli comuni - Piazza Città di Lombardia 1 - 20124 Milano - clara_bravi@regione.lombardia.it

Abstract - Nel corso degli ultimi anni ARPA Lombardia, Regione Lombardia e CNR-IRSA hanno collaborato alla stesura delle Direttive tecniche regionali per la gestione dei sedimenti degli invasi allo scopo di omogenizzare i processi di assoggettamento, valutazione e autorizzazione dei Progetti di Gestione e dei Piani Operativi (DGR 24 ottobre 2016 - n. X/5736). È in corso un approfondimento riguardante la definizione delle modalità di caratterizzazione dei sedimenti degli invasi, che nelle Direttive regionali è attualmente trattato in modo schematico.

Il Protocollo Analitico per la caratterizzazione ecotossicologica e chimica dei sedimenti (PrATo) di un invaso è oggetto di sperimentazione su diversi invasi della Lombardia. Il protocollo definisce le modalità per la caratterizzazione fisica, chimica ed ecotossicologica dei sedimenti dell'invaso e/o dei corpi idrici ad esso collegati ai fini della loro fluitazione e fornisce le indicazioni per l'interpretazione dei risultati.

Nel presente lavoro viene illustrato un esempio di applicazione del PrATo all'invaso di Valgrosina (Sondrio).

Keywords: sedimenti, invasi, caratterizzazione, ecotossicologia, protocollo

Introduzione

La normativa nazionale per la gestione e la salvaguardia degli invasi e del corpo recettore, prevede che le operazioni di svasso, sghiaimento e sfangamento delle dighe siano effettuate sulla base di un Progetto di Gestione, predisposto dal gestore, e finalizzato a definire sia il quadro previsionale di dette operazioni sia le misure di prevenzione e tutela del corpo ricettore, dell'ecosistema acquatico e delle attività alieutiche.

Inoltre, sono fissati anche i criteri per la predisposizione dei progetti di gestione che si applicano a tutti gli sbarramenti soggetti alle norme del DPR 1363/1959 "Approvazione del regolamento per la compilazione dei progetti, la costruzione e l'esercizio delle dighe di ritenuta" e s.m.i. Per gli sbarramenti non soggetti a queste

disposizioni, le Regioni stabiliscono quali invasi debbano essere sottoposti agli obblighi del DM 30/06/2004 e quali norme siano da applicare.

Per ottemperare a questi obblighi Regione Lombardia ha emanato le Direttive tecniche per la predisposizione, l'approvazione e l'attuazione dei progetti di gestione degli invasi (DGR. 24 ottobre 2016 - n. X/5736). In questo documento vengono disciplinati il procedimento di approvazione dei progetti di gestione degli invasi, i criteri di assoggettamento e i contenuti dei progetti, gli obblighi a cui i gestori devono ottemperare, le modalità di coordinamento delle operazioni degli sbarramenti posti sullo stesso bacino idrografico, le modalità di esecuzione e monitoraggio delle operazioni e i valori limite delle concentrazioni dei parametri critici nelle acque dei corpi idrici, durante le operazioni di fluitazione. CNR-IRSA, ARPA Lombardia e Regione Lombardia stanno sperimentando le modalità per la caratterizzazione dei sedimenti degli invasi e del corpo idrico recettore, riassunte nel «Protocollo Analitico per la caratterizzazione ecotossicologica e chimica dei sedimenti di un invaso (PrATo)».

Il Protocollo individua le modalità di definizione delle pressioni gravanti sull'invaso e del grado di interrimento dello stesso, definisce le modalità di progettazione di un piano di caratterizzazione fisica, chimica e ecotossicologica del sedimento dell'invaso e, eventualmente, del corpo idrico di valle. Infine, definisce i criteri per la valutazione della pericolosità del sedimento dell'invaso ai fini della fluitazione e per la valutazione degli effetti, dal punto di vista chimico ed ecotossicologico, delle operazioni.

Tra le varie sperimentazioni, il PrATo è stato applicato in occasione delle operazioni di fluitazione svolte sull'invaso di Valgrosina nel 2015: il gestore ha effettuato la caratterizzazione dei sedimenti dell'invaso secondo le indicazioni del PrATo.

L'invaso di Valgrosina, che sbarrava il torrente Roasco di Eita, è situato, a quota 1200 m s.m.l., in provincia di Sondrio e alimenta la centrale di Grosio. Oltre alle portate del suo immissario diretto, il bacino raccoglie quelle del torrente Roasco della Val di Sacco e quelle del bacino residuo del fiume Adda, degli affluenti Viola e Frodolfo e quelle turbinate dalla centrale di Premadio (invasi di S. Giacomo e Cancano).

Il bacino imbrifero diretto ha un'ampiezza pari a 60,35 km² e non ha pressioni antropiche significative, mentre il bacino allacciato, decisamente più esteso (531 km²), comprende il territorio dell'alta Valtellina, più densamente abitato e fruito turisticamente.

Le portate naturali che affluiscono all'invaso hanno un andamento annuo tipico dei corsi d'acqua alpini, con un periodo di morbida tra fine primavera e inizio estate e un periodo di magra in inverno.

Dal serbatoio non vengono rilasciate portate e il DMV è compensato da una presa nella Val di Sacco a cui, saltuariamente, si aggiungono anche le portate degli sfiori stagionali. Il torrente Roasco sfocia nel fiume Adda all'altezza dell'abitato di Grosotto.

Ogni anno nell'invaso si accumulano ingenti quantitativi di detrito (20.000-30.000 m³) provenienti dal bacino sotteso e allacciato. Per garantire la sicurezza nella gestione dello sbarramento ed il mantenimento della capacità di invaso del serbatoio, a partire dal 2000 sono state eseguite diverse asportazioni dei sedimenti mediante rimozione meccanica e operazioni di fluitazione.

Materiali e metodi

Rispettando i criteri del PrATo, in accordo con ARPA Lombardia, il gestore dell'invaso di Valgrosina ha raccolto 4 campioni superficiali di sedimento, prevalentemente lungo l'asse centrale del serbatoio.

I due campioni più prossimi allo sbarramento sono stati raccolti prima dell'avvio delle operazioni di fluitazione a invaso pieno, gli altri due a bacino vuoto al termine dello svasso.

Sui campioni prelevati sono state eseguite le seguenti analisi: granulometria, peso fresco, residuo secco a 105°C, percentuale di umidità, TOC, analisi chimica sul sedimento (arsenico, cadmio, cromo totale, mercurio, nichel, piombo, rame, zinco, IPA, PCB, idrocarburi), analisi chimica sull'eluato di sedimento (DOC, azoto ammoniacale, ammoniaca non ionizzata, nitriti, pH, arsenico, cadmio, cromo totale, nichel, piombo, rame, zinco, cloruri, fluoruri, solfati), test ecotossicologico su sedimento con *Heterocypris incongruens* (ISO 14371:2012), test ecotossicologico su eluato di sedimento con *Pseudokirchneriella subcapitata* (UNI EN ISO 8692:2012).

Risultati

Il risultato delle analisi granulometriche ha evidenziato in tutti i campioni una prevalenza delle componenti sabbia e limo; nei due campioni raccolti vicino alla diga è stata rilevata anche una buona rappresentatività dell'argilla.

I risultati delle analisi chimiche sono stati confrontati con le concentrazioni di riferimento previste nel PrATo (MacDonald et al., 2000) e con le concentrazioni soglia di contaminazione nel suolo e nel sottosuolo del D.Lgs 152/06 (tabella 1, allegato 5, titolo V, parte IV); nel primo caso non si sono evidenziati superamenti dei valori di TEC per i contaminanti organici, mentre si è osservato il superamento del valore PEC per l'arsenico in tutti i campioni. Questo elemento, di verosimile origine naturale, risulta presente in tutti i campioni di sedimento analizzati, in concentrazioni superiori ai limiti della colonna A della tabella 1 sopra citata.

Non sono risultati superamenti dei limiti imposti dal PrATo per i parametri misurati sull'eluato. Le concentrazioni degli analiti nell'eluato sono risultati conformi anche ai limiti di emissione per le acque di scarico.

Le analisi ecotossicologiche svolte sul sedimento hanno evidenziato l'assenza di tossicità in tutti i campioni. Nel test di tossicità effettuato con l'ostracode *Heterocypris incongruens* la mortalità è risultata sempre inferiore al 30% e l'inibizione della crescita sempre inferiore al 20%.

Le analisi ecotossicologiche dell'eluato su *Pseudokirchneriella subcapitata* sono state svolte testando, per ciascun campione, 5 concentrazioni comprese tra il 100% e il 20% dell'estratto iniziale allo scopo di calcolare i valori di EC₅₀, NOEC e LOEC. Alla concentrazione massima (100%) il valore di inibizione della crescita è risultato compreso tra 69% e 95%, ma già alla prima diluizione (67%) l'effetto sull'inibizione della crescita si è ridotto drasticamente, mostrando valori di inibizione della crescita inferiori al 20% in tutti campioni.

Il valore di EC₅₀ calcolato mediante il test con *Pseudokirchneriella subcapitata* è risultato compreso tra 77% [192 g/l di sedimento] e l'89% [222 g/l di sedimento] di diluizione dell'eluato. La maggiore diluizione a cui non si sono manifestati effetti tossici (NOEC) è compresa tra il 20% [49 g/l] e il 30% [74 g/l], mentre la minore diluizione a cui si è manifestato un effetto tossico (LOEC) è compresa tra il 30% [74 g/l] e il 44% [111 g/l].

Discussione

I sedimenti depositati nel bacino, come evidenziato dalle indagini granulometriche, sono prevalentemente costituiti da limo glaciale proveniente dai ghiacciai dell'alta

Valtellina che risultano allacciati all'invaso attraverso una fitta rete di prese e condotte.

Il particolare schema idraulico dell'invaso di Valgrosina influenza il tasso di sedimentazione dell'invaso e le caratteristiche fisiche, chimiche ed ecotossicologiche dello stesso.

L'elevato tasso di sedimentazione impone al gestore la programmazione di frequenti attività di rimozione dei sedimenti.

Le analisi fisico-chimiche dei sedimenti di Valgrosina effettuate nel corso degli anni hanno evidenziato che l'elemento che presenta maggiori criticità nell'invaso è l'arsenico.

La presenza di arsenico nelle rocce in Lombardia è ben conosciuta e la sua abbondante presenza nell'invaso potrebbe essere spiegata dalle caratteristiche mineralogiche naturali dell'area (ARPA, 2018).

Le analisi ecotossicologiche, pur evidenziando l'assenza di tossicità in tutti i campioni, hanno consentito di effettuare un confronto con i valori di diluizione del sedimento da adottare durante le operazioni di fluitazione.

I limiti imperativi, espressi in termini di solidi in sospensione, variano, in funzione della distanza dall'invaso, da 5 g/l, a 3 g/l a 1,5 g/l. Sono stati definiti anche limiti guida, in base ai quali la concentrazione media giornaliera non deve superare il doppio della media complessiva, mentre la media calcolata sulle concentrazioni rilevate in due ore non deve superare il triplo della media giornaliera (Regione Lombardia, 2008). Questi limiti sono calcolati valutando gli effetti fisici prodotti sugli elementi biologici, ed in particolare sulla fauna ittica.

Nel caso di studio, queste concentrazioni, in particolare i limiti imperativi, sono risultate inferiori rispetto ai valori di NOEC calcolati mediante il test di tossicità con *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Durante le operazioni, e nei mesi precedenti e successivi alle stesse, il gestore ha eseguito il monitoraggio di alcuni parametri fisico-chimici, e di alcune componenti biologiche (macroinvertebrati e fauna ittica) e morfologiche in 4 stazioni a valle dell'invaso. I valori di concentrazione limite imposti dal provvedimento autorizzatorio sono stati rispettati e il monitoraggio degli effetti causati dalle attività di fluitazione sul corpo idrico di valle ha evidenziato, a un anno dal termine delle attività, il recupero delle condizioni precedenti la fluitazione.

Conclusioni

Dallo studio eseguito sul bacino di Valgrosina è emerso che, ai fini della valutazione della qualità fisico-chimico-ecotossicologica dei sedimenti di un invaso, è necessario prendere in considerazione numerosi fattori. L'ampiezza e la tipologia dei bacini imbriferi sotteso e allacciato influenzano il tasso di interrimento e le caratteristiche qualitative dei sedimenti nell'invaso. L'eccessivo accumulo di sedimenti, oltre a rappresentare un problema di sicurezza e di riduzione della capacità utile di invaso contribuisce a concentrare nel tempo i composti chimici. La ripartizione e la biodisponibilità dei contaminanti risultano fortemente influenzati dalle caratteristiche fisico-chimiche delle acque e dei sedimenti. Durante la fluitazione, con le acque, vengono rilasciate ingenti quantità di sedimenti, che possono portare alla rimobilizzazione degli inquinanti e alla loro diffusione, tramite il sedimento fine, anche a lunghe distanze.

Il Protocollo sviluppato e sperimentato in questi anni in Regione Lombardia è stato pensato perseguendo lo scopo di valutare il potenziale tossico dei sedimenti mediante protocolli coerenti con la protezione della vita acquatica.

In futuro il protocollo continuerà ad essere applicato agli invasi lombardi in cui sarà necessario effettuare una caratterizzazione dei sedimenti, allo scopo di verificare l'affidabilità delle soluzioni scelte per le operazioni di svasso, affinare i contenuti e individuare le criticità.

Bibliografia

A2A, Progetto di gestione dell'Invaso di Valgrosina. Revisione 1. Luglio 2010.

A2A, Bacino di Valgrosina - Piano Operativo Svasso 2015 e Piano di Monitoraggio chimico-fisico ed ecologico dello svasso 2015 – Piano delle attività. Luglio 2015.

A2A, Bacino di Valgrosina - Caratterizzazione del sedimento. Dicembre 2015.

A2A, Bacino di Valgrosina - Monitoraggio delle operazioni di svasso 2015. Ottobre 2016

ARPA, Stato delle acque sotterranee in Regione Lombardia. Rapporto triennale 2014-2016. Giugno 2018

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

ISPRA, Standard di qualità di sedimenti fluviali e lacuali. Criteri e proposta. Rapporti 154/2011. Bacino di Valgrosina.

MacDonald D.D., Ingersoll C.G. & Berger T.A. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 39: 20-31

Regione Lombardia, Definizione dell'impatto degli svassi dei bacini artificiali sull'ittiofauna e valutazione di misure di protezione. Quaderno di Ricerca della Regione Lombardia n° 90 del 2008

TERRENI PROVENIENTI DA SCAVI MECCANIZZATI: VALUTAZIONE DELLA LORO ECOTOSSICITÀ

by I. Lacchetti^a, P.M.B. Gucci^b, P.Grenni^c, L. Patrolecco^d, E. Galli^e, V.G. Muzzini^f, E. Donati^g, A. Finizio^h, A. Barra Caraccioloⁱ

^a Istituto Superiore di Sanità (ISS) - Dipartimento Ambiente e Salute - Reparto Ecosistemi e Salute, Roma - ines.lacchetti@iss.it

^b Istituto Superiore di Sanità (ISS) - Dipartimento Ambiente e Salute - Reparto Esposizione a contaminanti in aria e suolo e da stili di vita, Roma - paola.gucci@iss.it

^c Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), Roma - grenni@irsa.cnr.it

^d Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), Roma - patrolecco@irsa.cnr.it

^e Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET-CNR), Roma - emanuela.galli@cnr.it

^f Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET-CNR), Roma - valerigiorgio.muzzini@cnr.it

^g Istituto per i Sistemi Biologici (ISB-CNR), Roma - enrica.donati@cnr.it

^h Università degli Studi Bicocca, Milano - antonio.finizio@unimib.it

ⁱ Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), Roma - barracaracciolo@irsa.cnr.it

Abstract - Gli scavi meccanizzati in sotterraneo per la realizzazione di gallerie e tunnel effettuati con fresa TBM-EPB (*Tunnel Boring Machine- Earth Pressure Balance*), necessitano dell'utilizzo di prodotti schiumogeni lubrificanti per coadiuvare il processo di scavo. Il componente principale di diversi prodotti presenti in commercio è il tensioattivo anionico sodio lauril etere solfato (SLES). Nonostante questo composto sia considerato biodegradabile, sono poche le informazioni in letteratura sul suo destino ambientale e sui possibili effetti ecotossicologici dovuti alla sua presenza nei materiali di scavo da qualificare come sottoprodotti per diversi utilizzi.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di verificare l'ecotossicità di due terreni aventi differenti caratteristiche geopedologiche e condizionati con due diversi prodotti schiumogeni contenenti SLES, allo scopo di poterne valutare la compatibilità ambientale per un loro possibile riutilizzo a scopi ambientali.

A tal fine sono stati allestiti direttamente in cantiere dei mesocosmi contenenti i terreni provenienti dal sito di scavo condizionati con le reali dosi di schiumogeno utilizzate per la TBM. Su campioni di terreno prelevati a diversi tempi sperimentali di maturazione e sui rispettivi estratti acquosi, è stata applicata una batteria di saggi ecotossicologici con organismi test rappresentativi di diversi livelli trofici. L'insieme dei risultati ottenuti dai diversi test ha mostrato una diversa ecotossicità attribuibile alle caratteristiche litologiche del terreno, al tipo e quantità di prodotto schiumogeno utilizzato per il condizionamento e alla sensibilità dell'organismo saggiato, sottolineando l'importanza dell'approccio sito-specifico per tali studi.

Keywords: terre e rocce da scavo, agenti schiumogeni, mesocosmi, saggi ecotossicologici, SLES

Introduzione

Negli ultimi anni la realizzazione di gallerie di grandi opere ingegneristiche, con la produzione di elevate quantità di terreno e rocce da scavo, viene effettuata mediante scavo meccanizzato con frese di tipo TBM-EPB. Tale tecnologia necessita dell'utilizzo di agenti schiumogeni fluidificanti, i cui componenti principali sono spesso tensioattivi anionici come il sodio lauril etere solfato (SLES). Attualmente non esistono limiti legislativi sul contenuto residuale di SLES, sia a livello italiano (D.Lgs. 152/2006; D.M. 10 agosto 2012, n. 161; D.P.R. 13 giugno 2017, n. 120) che europeo, utili per poter qualificare il materiale proveniente dallo scavo come sottoprodotto.

La compatibilità ambientale del terreno può essere valutata attraverso l'applicazione di test ecotossicologici che hanno il vantaggio di essere sensibili alla miscela di sostanze che compongono il prodotto commerciale utilizzato, anche quelle presenti in minore percentuale e non necessariamente specificate nelle schede tecniche di produzione, fornendo un risultato in termini di effetto che è indipendente dalla determinazione specifica dei singoli componenti la miscela (Grenni et al., 2018; Barra Caracciolo et al., 2017; 2019).

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare, attraverso studi ecotossicologici, la compatibilità ambientale di due differenti terreni provenienti da uno stesso sito di scavo e condizionati con due prodotti schiumogeni contenenti il tensioattivo anionico SLES in diversa percentuale. I dosaggi utilizzati per il condizionamento riflettevano quelli reali di scavo. Al fine di riprodurre i tempi di maturazione dello smarino nel sito di scavo, aliquote di terreno sono state campionate ed analizzate a differenti tempi, utilizzando una adeguata batteria di organismi test rappresentativi sia del comparto acquatico che terrestre.

Materiali e metodi

Una serie di mesocosmi in calcestruzzo riempiti con i terreni condizionati (del volume di circa 1 m³) sono stati allestiti all'aperto in un sito di scavo per riprodurre, in scala ridotta ma realistica, la maturazione dello smarino che può essere realizzata a terra o in vasca direttamente in cantiere per consentire la naturale degradazione dei prodotti schiumogeni. La sperimentazione ha riguardato due tipologie di terreno (T1 e T2) con differenti caratteristiche geopedologiche condizionate con due diversi agenti schiumogeni (AS1: SLES <30%; AS2, SLES: 10-20%). Il condizionamento con i prodotti selezionati è stato effettuato con gli stessi parametri (*Treatment Ratio*-TR, *Foaming Injection Ratio*-FIR e *Foaming Expansion Ratio*-FER; Peila, 2014; Peila et al., 2016) utilizzati per la TBM e corrispondenti alle condizioni di impiego massime possibili per lo scavo della galleria. I valori dei parametri di condizionamento dei terreni sono riportati nelle successive Tabelle 1 e 2.

Tabella 1. Parametri di condizionamento per il terreno T1

Agente schiumogeno	Concentrazione Schiumogeno	Acqua [%]	FIR [%]	FER	TR L/m ³
AS1	1,3	14	40	15	0,35
AS2	2,2	14	40	15	0,59

FIR = Foam injection Ratio; FER = Foam Expansion Ratio; TR = Treatment Ratio

Tabella 2. Parametri di condizionamento per il terreno T2

Agente schiumogeno	Concentrazione Schiumogeno [%]	Acqua [%]	FIR [%]	FER	TR L/m ³
AS 1	2,0	3	84	15	2,12
AS 2	2,6	4	84	15	1,46

FIR = Foam injection Ratio; FER = Foam Expansion Ratio; TR = Treatment Ratio

Il terreno T1 era composto da ghiaia (56,7%), sabbia (23,1%), limo (14,1%) e argilla (6,1%). Il terreno T2 era costituito per la maggior parte da ghiaia (88,3%), seguita da sabbia (9,1%), limo (2,0%) e argilla (solo 0,6%).

A diversi tempi di maturazione (0, 7, 14, 28 giorni) sono stati prelevati campioni di terreno dai mesocosmi per eseguire una serie di test ecotossicologici, utilizzando organismi rappresentativi di differenti livelli trofici sia del comparto acquatico che terrestre, utilizzando il terreno condizionato o l'estratto acquoso prodotto dallo stesso (rapporto 1:10 terreno:acqua).

In particolare sul terreno sono stati effettuati i seguenti saggi a lungo termine: test di fitotossicità a 21 giorni mediante analisi dell'accrescimento della specie vegetale *Lepidium sativum* (OECD 208, 2004) e test di sopravvivenza e riproduzione (28 giorni) con la specie di lombrico *Eisenia foetida* (OECD 222, 2016). Sull'estratto acquoso (CEN 12457-2) sono stati eseguiti i seguenti test di ecotossicità acuta a breve termine: inibizione della luminescenza del batterio *Vibrio fischeri* (UNI EN ISO, 2009), test di germinazione del crescione *Lepidium sativum* (USEPA, 1996), test sugli embrioni del pesce *Danio rerio* (OECD 236, 2013) e test di sopravvivenza a 48h del lombrico *Eisenia foetida* (OECD 207, 1984).

Risultati

Sintesi dei risultati dei test ecotossicologici

Test su terreno:

Per quanto riguarda il test di accrescimento con *L. sativum*, si osserva che i valori degli Indici di Accrescimento (IA%) riscontrati sia nel terreno T1 che in quello T2 non condizionati (che rappresentano il Controllo) sono molto bassi (valore di IA mediato sui 4 tempi: T1 3,7%; T2 2,8%). Pertanto entrambi i terreni non sono risultati idonei per la crescita di tale specie vegetale. L'aggiunta degli agenti schiumogeni-non solo non provoca alcun effetto tossico ma, nel caso del terreno T1, sembra incrementare l'IA che comunque rimane molto basso per tutta la durata della sperimentazione (valore di IA mediato per i due terreni sui 4 tempi di campionamento: 3,3% per entrambi i prodotti).

Il test di ecotossicità con *E. foetida* mostra risultati diversi a seconda del tipo di terreno considerato; infatti, le concentrazioni di entrambi gli schiumogeni nel terreno T1 non sembrano produrre effetti significativi sulla specie *E. foetida*, mentre nei mesocosmi di terreno T2 si rileva una mortalità elevata sia nel terreno non condizionato che in quello condizionato con entrambi gli schiumogeni.

Test su elutriato:

Relativamente al test di germinazione, a 7 giorni di maturazione in mesocosmo dei terreni T1 e T2 condizionati con i due prodotti schiumogeni, non si evidenzia alcun effetto tossico sulla germinazione della specie vegetale *L. sativum*. Anche per quanto riguarda il saggio con *E. foetida*, la presenza di entrambi i prodotti schiumogeni non

produce effetti significativi sull'organismo testato sia nel terreno T1 che nel terreno T2.

Il test di inibizione della bioluminescenza del batterio *V. fischeri* mostra che a 7 giorni di maturazione in mesocosmo il terreno T1 condizionato con i due prodotti schiumogeni non produce effetti tossici sull'organismo testato. Al contrario, tutti i campioni prelevati dal terreno T2 condizionato con entrambi i prodotti schiumogeni esibiscono una notevole tossicità per il batterio (valori sempre superiori al 75% di effetto) per tutta la durata della sperimentazione.

Analoghe considerazioni valgono per il test di tossicità condotto con l'embrione di pesce *D. rerio*; il terreno T1, infatti, non mostra mai valori di tossicità significativi per l'organismo ai diversi tempi analizzati; al contrario, il terreno T2 risulta sempre altamente tossico con entrambi i prodotti schiumogeni utilizzati per il condizionamento e tale effetto non diminuisce per tutta la durata della sperimentazione (28 giorni). Unico dato discordante riscontrato è quello relativo al terreno T2 condizionato con l'agente schiumogeno AS1, in quanto al tempo 7 giorni non mostra alcuna tossicità.

Discussione

I test ecotossicologici sono un valido strumento per rilevare l'effetto di sostanze potenzialmente tossiche presenti in un determinato ambiente. L'effetto tossico che un contaminante può esercitare, infatti, è legato non solo all'entità di esposizione dell'organismo al contaminante stesso (ossia alla sua concentrazione e al tempo di permanenza nell'ambiente) ma anche alla sua biodisponibilità e capacità di interagire con la matrice ambientale (ad esempio per assorbimento e adsorbimento); inoltre, non va sottovalutato il possibile effetto sinergico dovuto alla copresenza di più sostanze.

In questo studio, l'applicazione di una batteria di organismi test ha permesso di effettuare una valutazione cautelativa e affidabile dell'impatto ecotossicologico che le terre e rocce provenienti dallo scavo meccanizzato e contenenti concentrazioni residuali di prodotto schiumogeno possono esercitare sull'ambiente, al fine di poter considerare il loro riutilizzo come sottoprodotto.

I risultati hanno evidenziato che gli schiumogeni selezionati, alle dosi utilizzate per il condizionamento dei terreni, non generano effetti significativi sulle specie terrestri utilizzate per i test acuti e cronici (test di germinazione e accrescimento con *Lepidium sativum*, test di mortalità e riproduzione della specie di Lumbricidae *Eisenia foetida*), effettuati sulle due tipologie di terreno condizionato e sugli elutriati prodotti dagli stessi terreni.

Per quanto riguarda i saggi condotti sugli elutriati, le specie acquatiche *V. fischeri* e *D. rerio* sono risultate più sensibili alle concentrazioni residuali di agenti schiumogeni, evidenziando effetti di tossicità significativi soprattutto per una tipologia di terreno.

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno mostrato una diversa ecotossicità ascrivibile alla tipologia di terreno, allo schiumogeno utilizzato per il condizionamento (AS1 o AS2) e all'organismo test. L'approccio sperimentale eseguito conferma l'importanza di effettuare una valutazione ecotossicologica sito-specifica nei progetti di realizzazione di scavi in sotterraneo per poter ottenere indicazioni cautelative e al contempo realistiche sulla compatibilità ambientale dei terreni prodotti e contenenti quantità residue di agenti schiumogeni. Tale approccio, sostenuto da misure specifiche di

degradabilità del componente principale del prodotto schiumogeno utilizzato per il condizionamento, consente inoltre di offrire indicazioni operative sul tempo minimo di maturazione del materiale di scavo, da effettuarsi in cantiere, necessario affinché questo possa essere utilizzato come sottoprodotto per diversi scopi ambientali, senza procurare rischi per gli ecosistemi.

Nel contesto della cosiddetta "economia circolare", l'individuazione e applicazione di una batteria di saggi ecotossicologici ai terreni condizionati unitamente alla valutazione analitica sito-specifica dei tempi di persistenza del prodotto schiumogeno, si sono rivelati strumenti utili per la riqualificazione di una risorsa naturale preziosa e non rinnovabile, il suolo, che altrimenti verrebbe trattata come rifiuto, con conseguenti costi onerosi sia dal punto di vista ambientale che di realizzazione del progetto di scavo.

Bibliografia

Barra Caracciolo A, Cardoni M, Pescatore T, Patrolecco L 2017. Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunnelling. *Environ. Poll.* 226: 94-103.

Barra Caracciolo A, Ademollo N, Cardoni M, Di Giulio A, Grenni P, Pescatore T, Rauseo J, Patrolecco L 2019. Assessment of biodegradation of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate used in two foaming agents for mechanized tunnelling excavation, *J. Hazard. Mater.* 365: 538–545.

EN 12457-2 2002. Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 2: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 4 mm (without or with size reduction)

Grenni P, Barra Caracciolo A, Patrolecco L, Ademollo N, Rauseo J, Saccà ML, Mingazzini M, Palumbo MT, Galli E, Muzzini V, Polcaro CM, Donati E, Lacchetti I, Di Giulio A, Gucci PMB, Beccaloni E, Mininni G 2018. A bioassay battery for the ecotoxicity assessment of soils conditioned with two different commercial foaming products. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 1067-1077.

OECD 1984. Guideline for the testing of chemicals. No 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests

OECD 2004. Guideline for the testing of chemicals. No 208. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test

OECD 2013. Guideline for the testing of chemicals. No 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

OECD 2016. Guideline for the testing of chemicals. No 222. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei*), Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

Peila D, Picchio A, Martinelli D, Negro ED 2016. Laboratory tests on soil conditioning of clayey soil, *Acta Geotech.* 11: 1061–1074.

Peila D 2014. Soil conditioning for EPB shield tunnelling, *KSCE J. Civ. Eng.* 8: 831–836.

UNI EN ISO 11348-3 2009. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti) - Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati

US EPA 1996. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test.

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DEI SEDIMENTI DEGLI INVASI AI FINI DELLA FLUITAZIONE: IL PROTOCOLLO PRATO

by L. Marziali^a, L. Valsecchi^b, E. Oteri^b, A. Schiavori^b, P. Tirozzi^b, S. Tasselli^b, G. Tartar^b, P. Genoni^b, C. Borlandelli^b, E. Lorenzi^b, S. Castelli^b, A. Bellomi^b, C. Bravi^b, L. Guzzella^a

^a CNR-IRSA, Istituto di Ricerca Sulle Acque, S.S. Brugherio, Via del Mulino 19, 20861 Brugherio (MB). E-mail: marziali@irsa.cnr.it

^b ARPA Lombardia, Via Ippolito Rosellini 17, 20124 Milano

^c Regione Lombardia, D.G. Enti locali, Montagna e Piccoli Comuni, Piazza Città di Lombardia 1, 20124 Milano

Abstract – La caratterizzazione della tossicità potenziale dei sedimenti degli invasi è un'informazione essenziale per programmare adeguatamente le operazioni che implicano il rilascio a valle del materiale depositato e garantire così la funzionalità delle opere di presa delle dighe e il ripristino della capacità utile. È infatti necessario garantire la tutela delle comunità acquatiche nei tratti fluviali a valle, ai sensi della Direttiva Europea sulle Acque 2000/60/EC. Oltre a minimizzare l'impatto fisico, è necessario valutare anche il potenziale effetto ecotossicologico determinato dalla presenza di microinquinanti nei sedimenti. In assenza di riferimenti normativi per i sedimenti d'acqua dolce, l'approccio più cautelativo è quello del peso dell'evidenza sperimentale basata sull'analisi chimica, ecotossicologica, ecologica e, in alcuni casi, anche attraverso la valutazione del bioaccumulo. In questo contributo viene mostrata la caratterizzazione dei sedimenti di un invaso lombardo ai fini della fluitazione secondo il "Protocollo per la caratterizzazione chimica ed ecotossicologica dei sedimenti degli invasi" (PrATo), in fase di sperimentazione.

Keywords: dighe, sedimenti contaminati, elementi in traccia, Triad

Introduzione

L'interrimento progressivo degli invasi dovuto all'accumulo di sedimenti è uno dei principali problemi legati alla gestione delle dighe: il volume di sedimenti che si deposita ogni anno riduce infatti la capacità utile e può minacciare la funzionalità delle opere di presa della diga stessa. In Regione Lombardia, dove gli invasi sono più di 600, la tecnica più comunemente utilizzata per contrastare l'interrimento è la fluitazione, ossia un rilascio controllato dei sedimenti nel corpo idrico fluviale a valle dell'invaso. Queste operazioni vengono programmate dai Gestori degli invasi in accordo con Regione Lombardia, predisponendo Piani di Gestione ai sensi del D.M. 30/06/2004 e seguendo le indicazioni riportate nelle "Direttive tecniche per la predisposizione, l'approvazione e l'attuazione dei Progetti di Gestione degli invasi" (D.G.R. 5736/2016 della Regione Lombardia). In particolare, è prevista una caratterizzazione chimica ed ecotossicologica dei sedimenti derivata dal protocollo PrATo ("Protocollo per la caratterizzazione chimica ed ecotossicologica dei sedimenti degli invasi"), sviluppato dal CNR-IRSA in collaborazione con ARPA Lombardia e Regione Lombardia (Marziali et al. 2017a). È noto, infatti, che i sedimenti fini accumulati negli invasi possono presentare elevate concentrazioni di microinquinanti,

quali elementi in traccia e composti organici come IPA e PCB, che in molti casi superano le concentrazioni di effetto riportate in letteratura per gli organismi acquatici (Marziali et al. 2017b). Il protocollo PrATo, in corso di sperimentazione su alcuni casi di studio, fornisce indicazioni operative per valutare il rischio di tossicità per gli organismi acquatici del corpo idrico di valle secondo un approccio simile al Sediment Quality Triad (Chapman e Anderson 2005), e prende in considerazione gli esiti della caratterizzazione chimica, ecotossicologica, ecologica e, nei casi più critici, del bioaccumulo, per valutare il potenziale tossico dei sedimenti prima della fluitazione e, sulla base di tali risultati, per programmare adeguatamente le operazioni di svaso. In questo contributo vengono riportati i risultati della caratterizzazione effettuata sul torrente Varrone (LC), caratterizzato lungo il suo corso dalla presenza di una diga a scopo idroelettrico, secondo le procedure indicate da PrATo.

Materiali e metodi

Il torrente Varrone si trova in Provincia di Lecco e sfocia nel Lago di Como nelle vicinanze di Dervio. A circa 12 km dalla foce è presente una diga, che determina la formazione di un invaso dalla capacità utile di circa di 100000 m³. Subito a monte dell'invaso è presente lo scarico di un depuratore che colletta reflui civili e industriali: in particolare, sono presenti lavorazioni di metalli che, in alcune occasioni, sono risultati presenti nelle acque del Varrone con concentrazioni superiori agli Standard di Qualità Ambientale (dati ARPA Lombardia). Da qui l'interesse di caratterizzare la tossicità potenziale dei sedimenti, in vista di future operazioni di manutenzione programmate dal Gestore dell'invaso che prevedano un rilascio dei sedimenti a valle.

Sedimenti e organismi macrobentonici (separati per taxon: Ditteri Athericidae, Limoniidae, Tipulidae, Tabanidae; Efemerotteri *Baetis*, Tricotteri Hydropsychidae e Rhyacophilidae) sono stati campionati in 4 siti lungo il Varrone, due a monte (siti 1 e 2) e due a valle dell'invaso (siti 3 e 4), in cinque sopralluoghi tra marzo e ottobre 2018. Lo scarico si immette nelle acque del Varrone tra i siti 1 e 2. Sono stati inoltre campionati i sedimenti dell'invaso.

Sedimenti e organismi sono stati sottoposti ad analisi chimiche: elementi in traccia mediante ICP-OES; composti organici quali IPA e PCB mediante GC-MS. Al fine di normalizzare le concentrazioni dei composti organici, nei sedimenti è stato determinato il carbonio organico totale e negli organismi il contenuto lipidico. I sedimenti sono stati sottoposti a test cronici di contatto con l'Ostracode *Heterocypris incongruens* (protocollo ISO 14371:2012) e con il Dittero *Chironomus riparius* (protocollo OECD n. 218, 2004). La comunità macrobentonica è stata campionata nei quattro siti fluviali in due stagioni secondo protocollo multihabitat proporzionale.

Risultati e discussione

Le concentrazioni di elementi in traccia, IPA e PCB nei sedimenti dell'invaso sono risultate significativamente più elevate rispetto a quelle riscontrate nel torrente e influenzano i valori osservati nei siti a valle (siti 3 e 4), che si discostano da quelli del sito 1 (considerato come riferimento, in quanto il sito 2 è influenzato dallo scarico di Premana, che è anche sorgente di contaminazione) (Fig. 1). Il confronto con i valori di *Threshold Effect Concentrations* (TEC) e di *Probable Effect Concentrations* (PEC) (MacDonald et al. 2000), considerati come soglie di rischio per gli organismi acquatici che vivono a contatto con i sedimenti, evidenzia superamenti dei TEC

nell'invaso per Cu, Ni, Cr e As. Sono stati quindi ritenuti necessari approfondimenti ecotossicologici focalizzati sulla matrice sedimento.

I test ecotossicologici hanno evidenziato mortalità cronica per *H. incongruens* non significativa nel sito 1, fino al 90% nel sito 2 e fino al 30% nell'invaso e nei siti a valle (ma non significativamente diversa dal controllo) (Fig. 2a). Questo organismo è risultato più sensibile rispetto a *C. riparius*, che ha mostrato una risposta cronica a livello subletale, con un ritardo nel tempo di sfarfallamento fino al 60% nel sito 2 e fino all'8% a valle dell'invaso. L'endpoint inibizione della crescita per *H. incongruens* potrebbe però essere influenzato dalla granulometria dei sedimenti (Fig. 2b): la risposta della crescita alla presenza di sedimenti fini è stata infatti evidenziata da alcuni studi specifici (es. Casado-Martinez et al. 2016).

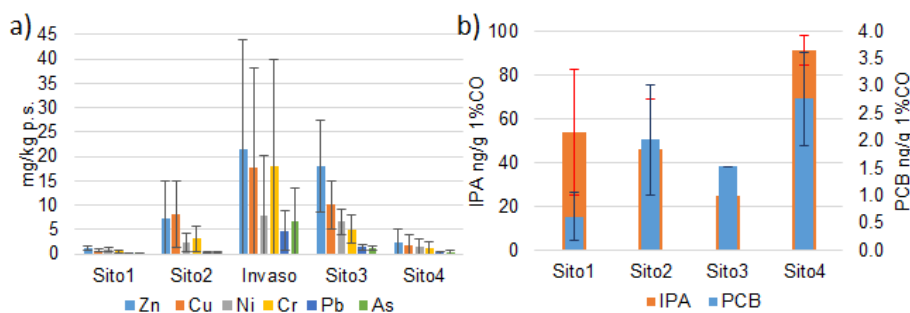


Figura 1. Concentrazioni nei sedimenti del Varrone (siti 1-4) e dell'invaso di: a) alcuni elementi in traccia (riferite alla frazione granulometrica < 2 mm); b) IPA e PCB [normalizzate sull'1% di carbonio organico]. I siti sono ordinati da monte a valle. Le colonne rappresentano il valore medio per ogni sito, le barre la deviazione standard.

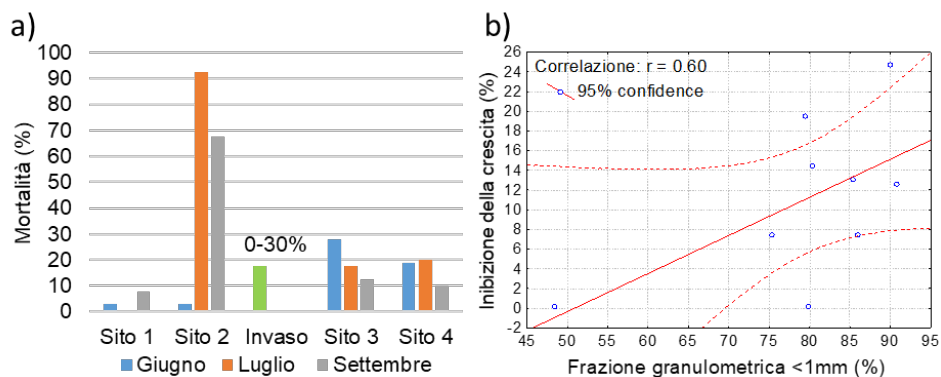


Figura 2. a) Mortalità percentuale per *H. incongruens* esposto ai sedimenti del torrente Varrone (siti 1-4) e dell'invaso (per quest'ultimo, rappresentato in verde, viene indicato il valore medio e il range di valori). b) Relazione tra percentuale granulometrica < 1 mm e inibizione della crescita per *H. incongruens*.

L'analisi del bioaccumulo ha evidenziato il diverso comportamento dei taxa. Per quanto riguarda gli elementi in traccia, i Ditteri presentano in generale i valori più elevati, seguiti da *Baetis* e, infine, Tricotteri. Dato che la quasi totalità dei metalli mostra biodiluzione nelle catene trofiche (Goodyear e McNeill 1999), è ipotizzabile che collettori e raschiatori (Ditteri e Efemerotteri) possano mostrare livelli più elevati

rispetto ai predatori (Tricotteri Rhyacophilidae) in virtù del loro livello trofico più basso. Al contrario, IPA e PCB sono risultati paragonabili nei tre taxa dopo normalizzazione su fase lipidica. Una maggiore biodisponibilità di elementi come Fe, Cu, Ba, Ni, Cr e Sb e di PCB si evidenzia nei siti 2 e 3 rispetto agli altri (Fig. 3): l'analisi chimica dei sedimenti aveva evidenziato che questi contaminanti risultano arricchiti nei siti a valle dello scarico di Premana. Per quanto riguarda gli IPA, invece, non emerge un chiaro trend monte-valle, a conferma dell'origine diffusa di questa classe di composti. Alcune pubblicazioni scientifiche recenti (es. Awrahman et al. 2016) hanno dimostrato una relazione significativa tra la concentrazione di elementi in traccia nei Tricotteri del genere *Hydropsyche* e l'abbondanza di Efemerotteri nelle comunità macrobentoniche (in particolare Heptageniidae e Ephemerellidae): gli Efemerotteri sono infatti considerati un taxon molto sensibile alla presenza di metalli e il bioaccumulo nel taxon resistente *Hydropsyche* ne indica efficacemente la biodisponibilità. Questi studi riportano concentrazioni soglia nei Tricotteri oltre le quali l'abbondanza degli Efemerotteri inizia a diminuire. Nel Varrone non è sempre stato possibile analizzare il bioaccumulo negli Hydropsychidae a causa della scarsità di materiale biologico, ma considerando il gruppo Tricotteri (ossia Rhyacophilidae+Hydropsychidae) alcune soglie potrebbero risultare superate: in particolare, per lo Zn nei siti 3 e 4 [soglia di 325 mg kg⁻¹ p.s. secondo Awrahman et al., 2016] e per il Cu nel sito 3 [soglia di 154 mg kg⁻¹ p.s.] (Fig. 3b). A supporto dell'ipotesi, la comunità macrobentonica nel complesso ha mostrato un numero di taxa inferiore nei siti 2 e 3 rispetto ai siti 1 e 4. Nel sito 3, in particolare, il numero totale di taxa è risultato circa la metà (10 taxa) rispetto al sito 1 (23 taxa) e gli Heptageniidae hanno mostrato abbondanze inferiori (4 individui/m²) rispetto a quanto rilevato negli altri siti (846 ind/m² nel sito 1; 54 ind/m² nel sito 2 e 116 ind/m² nel sito 4).

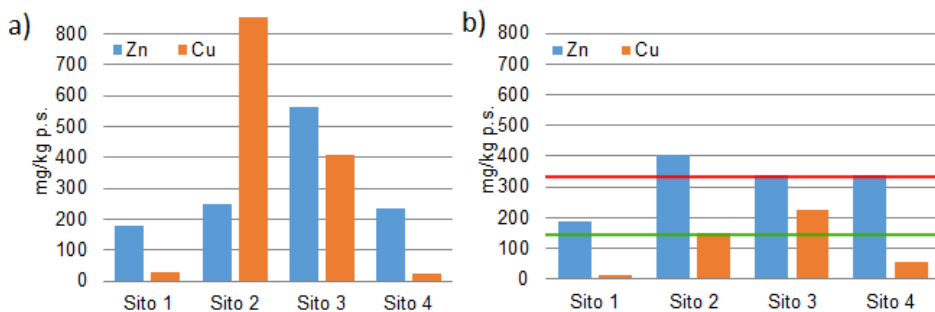


Figura 3. Concentrazioni di zinco e rame in Ditteri (a) e Tricotteri (b) campionati nel Varrone (siti 1-4) in settembre 2018. Sono rappresentate le concentrazioni soglia nei Tricotteri oltre le quali iniziano a diminuire nella comunità le abbondanze di alcune famiglie di Efemerotteri sensibili alla presenza di metalli (Awrahman et al. 2016): linea rossa = 325 mg/kg p.s. di Zn; linea verde = 154 mg/kg p.s. di Cu.

Conclusioni

L'analisi di quattro diverse linee di evidenza ha permesso di definire in fase pre-svaso la variabilità naturale dei sedimenti nel sistema fluviale e la presenza di specifiche pressioni, costituendo un'analisi di rischio sito-specifica. Per quanto riguarda l'invaso, è emerso il superamento delle soglie di rischio per alcuni elementi in traccia nei

sedimenti, ma la tossicità non è risultata significativa. L'analisi del bioaccumulo ha invece evidenziato un'aumentata biodisponibilità a valle dell'invaso, con potenziale effetto sugli organismi macrobentonici più sensibili, quali gli Efemerotteri.

Alla luce di queste evidenze, secondo il PrATo le operazioni di rilascio di sedimenti a valle andranno condotte garantendo adeguate operazioni di lavaggio che diluiscano e redistribuiscono i sedimenti dell'invaso lungo il tratto fluviale a valle. A protezione delle comunità acquatiche fluviali, il rapporto di diluizione tra sedimenti e acqua da applicare durante la fluitazione dovrà rispettare le indicazioni riportate nelle "Direttive tecniche per la predisposizione, l'approvazione e l'attuazione dei Progetti di Gestione degli invasi" della Regione Lombardia, volte a minimizzare l'impatto fisico, senza necessità di ulteriori misure cautelative. L'applicazione del protocollo PrATo sul Varrone alla conclusione delle operazioni di rilascio dei sedimenti dall'invaso permetterà di verificarne l'esito, individuando e quantificando l'eventuale discostamento dalle condizioni pre-vaso e i tempi di recupero dell'ecosistema. Queste indicazioni saranno utili per valutare la necessità di rimodulazioni nella gestione delle operazioni di fluitazione future.

Ringraziamenti

I dati presentati sono stati raccolti nell'ambito dell'Accordo di collaborazione Art. 15, L. 241/90 tra Regione Lombardia e Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca Sulle Acque (CNR-IRSA) per lo sviluppo di attività inerenti la gestione delle acque superficiali e degli invasi (2018-2019).

Bibliografia

- Awrahman ZA, Rainbow PS, Smith BD, Khan FR, Fialkowski W 2016. Caddisflies *Hydropsyche* spp. as biomonitors of trace metal bioavailability thresholds causing disturbance in freshwater stream benthic communities. *Environ Pollut* 216: 793-805.
- Casado-Martinez C, Burga-Pérez KF, Bebon R, Ferard J-F, Vermeirssen ELM, Werner I 2016. The sediment-contact test using the ostracod *Heterocypris incongruens*: Effect of fine sediments and determination of toxicity thresholds. *Chemosphere* 151: 220-224.
- Chapman PM, Anderson J 2005. A Decision-Making Framework for Sediment Contamination. *Integrated Environmental Assessment and Management* 1(3): 163-173.
- Goodyear KL, McNeill S 1999. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review. *Sci Total Environ* 229: 1-19.
- ISO 14371: 2012. Water quality. Determination of freshwater sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). ISO 14371. ISO/TC 147/SC 5.
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 20-31.
- Marziali L, Guzzella L, Tartari G, Valsecchi L, Genoni P, Lorenzi E, Bravi C 2017a. Protocollo per la valutazione della tossicità dei sedimenti degli invasi ai fini della fluitazione. *Biologia Ambientale*, 31: 219-225.
- Marziali L, Tartari G, Salerno F, Valsecchi L, Bravi C, Lorenzi E, Genoni P, Guzzella L 2017b. Climate Change Impacts on Sediment Quality of Subalpine Reservoirs: Implications on Management. *Water* 9 (9): 680. doi:10.3390/w9090680.

OECD, 2004. Chironomid toxicity test using spiked sediment. Guideline for Testing of Chemicals No. 218. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris 2004.

DETERMINAZIONE DEI VALORI DI FONDO NATURALE DEI SEDIMENTI MARINI ABRUZZESI: LA RIVINCITA DELL'ECOTOSSICOLOGIA

G. Surricchio^a, N. d'Alessandro^b, L. Tonucci^b, E. Scamosci^a, A. Arizzi Novelli^a

^a Arta Abruzzo Distretto di Pescara - g.surricchio@artaabruzzo.it

^b Università degli Studi Chieti - Pescara - nicola.dalessandro@unich.it

Abstract – Negli anni '90, in Italia, l'ecotossicologia sembrava rivoluzionare l'approccio alla caratterizzazione delle matrici ambientali ed, in particolare, alla valutazione della qualità dei sedimenti marini; questa trasformazione, negli anni a seguire, è stata in realtà lenta e difficile. Il Decreto Ministeriale 173/2016 ha sancito una vera e propria "inversione culturale", riaffermando la centralità dell'approccio ecotossicologico, riconoscendone l'ufficialità e la priorità nell'esecuzione delle analisi dei sedimenti nell'ottica di una valutazione ponderata ed integrata; in particolare, nel processo di determinazione dei valori di fondo naturale, il decreto introduce il concetto di condizione inalterata dei sedimenti, prerequisito necessario per ammettere il campione nel set di dati utilizzabili; questo stato è conseguito quando i campioni sono privi di pericolo ecotossicologico.

Lo scopo del lavoro è stato quello di determinare i valori di fondo naturale dei sedimenti marini abruzzesi, valori ai quali ci si riferisce nella classificazione dei sedimenti scavati dai fondali marini. Lo screening di ammissibilità dei campioni alla trattazione statistica è stato effettuato tramite l'utilizzo di una batteria di saggi di tossicità applicata al sedimento ed alla matrice acquosa elutriato.

Keywords: sedimenti, batteria di saggi di tossicità, D.M. 173/16, metalli, valori di fondo naturale

Introduzione

La movimentazione e l'immersione in mare dei sedimenti marini è un tema di grande attualità ed interesse socio-economico che ha un impatto rilevante sul territorio, sull'ecosistema marino e, nel lungo periodo, condiziona gli aspetti geomorfologici, fisiografici e geochimici dello spazio costiero.

Le principali attività che implicano movimentazione di materiali scavati dai fondali marini sono il dragaggio di porti industriali, commerciali e turistici ai fini della conservazione delle condizioni di operatività e sicurezza della navigazione, l'adeguamento delle infrastrutture portuali, l'immersione in mare dei sedimenti, le opere di protezione delle coste e degli abitati dall'erosione da correnti e moto ondoso, il ripristino di tratti di spiaggia sommersi.

Le operazioni di escavazione, che devono essere condotte nel rigoroso rispetto dell'ambiente marino, consentono l'accumulo di materiale che rappresenta una risorsa adatta al riutilizzo: questa deve essere caratterizzata dal punto di vista fisico, chimico ed ecotossicologico allo scopo di poterne determinare la qualità e di stabilire

la destinazione più appropriata dei materiali, come il ripascimento di arenili o l'immersione in ambiente confinato.

Il D.M. 173/2016, regola la materia stabilendo opportuni criteri per le autorizzazioni, la progettazione dell'intervento, il campionamento, la classificazione, il riutilizzo ed il monitoraggio ambientale.

Per quanto concerne il territorio abruzzese, le principali attività di movimentazione dei sedimenti sono riconducibili ai dragaggi di porti commerciali e turistici ed alle attività di ripascimento degli arenili; nei sedimenti marini dei tratti di costa abruzzese si rileva la presenza di molteplici aree caratterizzate da contaminazione antropica situate quasi sempre in corrispondenza degli apporti fluviali dei numerosi corsi d'acqua che raccolgono, o hanno raccolto, i residui di lavorazione delle attività industriali e agricole presenti sul territorio.

La caratterizzazione dei sedimenti escavati, si effettua per confronto con valori di riferimento nazionali stabiliti dal D.M. 173 o con valori di fondo naturale appositamente determinati a livello locale e riferiti a sedimenti non contaminati da inquinanti di origine antropica.

Lo scopo del lavoro è stato quello di determinare i valori di fondo naturale dei sedimenti marini abruzzesi.

Materiali e metodi

I campioni di sedimento marino sono stati prelevati tramite motonave attrezzata, utilizzando la benna Van Veen; il prelievo ha interessato i primi centimetri dall'interfaccia acqua marina-sedimento.

Per quanto riguarda le analisi ecotossicologiche, il saggio di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* è stato applicato seguendo la metodica riportata nel manuale ICRAM (2001) mediante Microtox con esposizione dei batteri ai campioni di sedimento tal quale non centrifugato.

Il saggio di tossicità acuta con l'alga marina *Phaeodactylum tricornutum* è stato eseguito facendo riferimento alla norma ISO 10253:2016. Le colture algali sono state esposte in fase di crescita esponenziale a campioni di elutriato in 3 repliche. Gli organismi, sono stati incubati per un periodo di 72 ± 2 h al termine del quale sono stati fissati per permettere la lettura mediante contatore di cellule Beckman Coulter.

Il saggio sub-cronico di embriotossicità con il bivalve *Mytilus galloprovincialis* è stato effettuato in accordo con la metodica ASTM E724 (2012). Dopo la fase di fertilizzazione delle uova ed incubazione a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 h a campioni di elutriato in 3 repliche, sono state contate le larve ottenute distinguendole tra normali (D-shape) e anomale.

Per quanto riguarda la determinazione degli elementi metallici arsenico, cadmio, cromo, rame, nichel, piombo e zinco è stato utilizzato il metodo UNI EN ISO 11885:2009 che prevede l'utilizzo dello spettrometro ICP-OES. Le analisi del mercurio sono state effettuate impiegando il metodo EPA 7471 B 2007 attraverso spettroscopia di assorbimento atomico a vapori freddi (CVAAS). Il cromo VI è stato determinato per quantificazione spettrofotometrica del composto cromoforo che si forma per reazione con la difenilcarbazide.

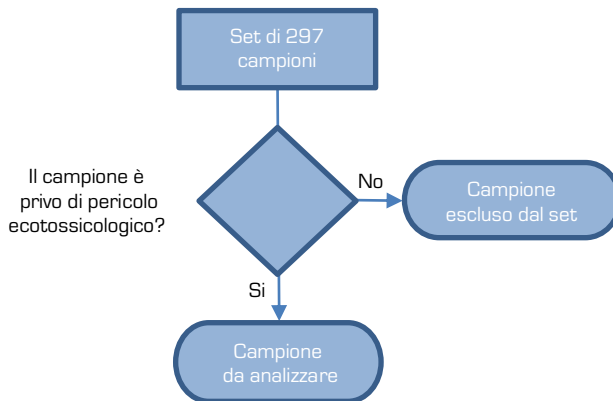
Risultati

La norma ISO 19258:2018 riferita ai suoli, distingue fra i termini "contenuto naturale geochimico" definito come la concentrazione di sostanze nei sedimenti, risultante da processi naturali geologici senza alcuna interferenza di origine antropica e "valore di

fondo naturale” definito come una caratteristica statistica del contenuto naturale geochimico di una sostanza nel sedimento.

Il valore di fondo naturale locale $L1_{90}$ non deve quindi esprimere una media ma la variabilità delle concentrazioni; per adempiere a questa finalità il D.M. 173 prevede l'applicazione della statistica del 90° percentile su un insieme di dati omogeneo provenienti da un set di campioni rappresentativi sotto il profilo geografico, geologico e geochimico.

Nel periodo 2011-2016 ARTA Abruzzo ha prelevato ed analizzato 297 campioni di sedimento marino in aree distanti da evidente disturbo antropico; i campioni sono stati processati attraverso la batteria di saggi ecotossicologici ed è stato adottato il seguente criterio per l'ammissione alle determinazioni chimiche:



Attraverso questo approccio, si è ottenuto un set ridotto di 139 campioni di sedimento marino risultati inalterati; questi campioni sono stati mineralizzati tramite termodigestore ed analizzati per la determinazione degli elementi metallici. Dalla matrice di dati ottenuta, ogni serie di metalli è stata elaborata statisticamente.

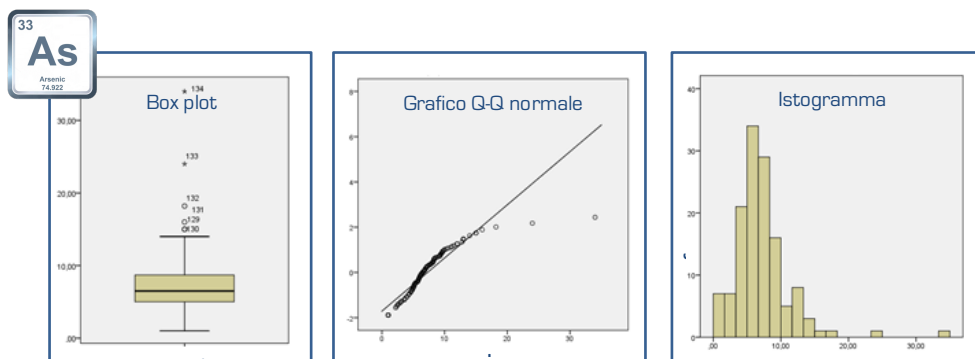
La gestione degli outliers si è basata sulla considerazione che il modello distributivo dei metalli nei campioni di sedimento non è noto a priori, solitamente non è gaussiano e comunque può differire per metalli diversi; pertanto, la valutazione dell'omogeneità della serie di dati condotta per la stima dei dati anomali, è stata effettuata utilizzando la statistica non parametrica: sono stati considerati dati non appartenenti al resto della distribuzione i valori che eccedono 3 volte i range interquartile.

La gestione dei valori al di sotto del limite di quantificazione del metodo analitico (LOQ), che non possono essere processati dal software statistico utilizzato, è stata condotta applicando delle regole decisionali in funzione della percentuale di casi rispetto alla dimensione della popolazione di appartenenza:

- $LOQ \leq 15 \%$: metodo di sostituzione. Le misure inferiori al limite di rilevabilità sono in percentuale limitata e possono essere sostituite da valori minimi pari a $LOQ/2$;
- $50 \% \leq LOQ \leq 90 \%$: test delle proporzioni. La popolazione è formata da una percentuale rilevante di valori inferiori al LOQ pertanto il test delle proporzioni raccomanda di utilizzare un percentile superiore ai casi percentuali di LOQ;
- $LOQ > 90 \%$: è stato adottato, come valore di fondo naturale locale, il valore di LOQ corrispondente al 90° percentile dei dati senza pre-trattazione statistica.

Oltre alla determinazione del valore di fondo naturale si è ritenuto opportuno comprendere la tipologia di distribuzione dei dati per singola variabile; questa informazione risulta utile per la scelta del test da utilizzare in fase di confronto fra valori di fondo e campioni di sedimento da classificare. Lo studio della distribuzione è stato condotto elaborando i dati con la statistica descrittiva ed avvalendosi dell'ausilio di metodi grafici.

A titolo di esempio si riportano i principali grafici utilizzati per il parametro Arsenico ed elaborati utilizzando il software IBM SPSS Statistic v22.



Il valore di fondo naturale locale $L1_{loc}$ è stato stimato come 90° percentile della serie di dati omogenea; per un dato metallo, nella serie di n concentrazioni ordinate in senso crescente, il 90° percentile è la i -esima concentrazione della serie scelta in modo che il numero dei valori inferiori a i costituisca il 90 % della popolazione n . Dalle analisi delle serie sono stati ottenuti i risultati riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Confronto fra i valori di fondo naturale abruzzesi $L1_{loc}$ ed i livelli chimici di riferimento nazionali $L1$ ed $L2$

Parametro	L1	$L1_{loc}$	L2
	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.
Arsenico	12	12	20
Cadmio	0,3	0,4	0,80
Cromo	50	64	150
Cromo VI	2	< 0,2	2
Rame	40	18	52
Mercurio	0,3	0,06	0,80
Nichel	30	36	75
Piombo	30	17	70
Zinco	100	63	150

Conclusioni

I valori $L1_{loc}$ ottenuti sono risultati uguali o inferiori ai valori di riferimento nazionali $L1$, tranne che per i metalli cromo, cadmio e nichel; questi risultano comunque inferiori al livello chimico $L2$, concentrazione di riferimento limite, indice di contaminazione e di probabili risposte ecotossicologiche positive.

In considerazione della relativa omogeneità della provincia geochimica considerata, i valori di fondo naturale locali determinati possono essere considerati rappresentativi di tutti i fondali regionali abruzzesi. I livelli chimici di riferimento locale $L1_{loc}$ consentiranno una applicazione adeguata del D.M. 173 nella classificazione dei sedimenti dell'area marino-costiera della Regione Abruzzo; ulteriori campagne di campionamento potranno essere finalizzate alla definizione di valori sito-specifici ed al confronto dei valori con le regioni limitrofe.

Bibliografia

ASTM E724 - 98:2012. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs.

Decreto Ministeriale 173 del 15 luglio 2016.

EPA 7471 B 2007. Mercury in solid or semisolid waste (manual cold-vapor technique).

ICRAM Appendice 2 2001. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003).

ISO 19258:2018. Soil quality - Guidance on the determination of background values.

ISO 10253:2016. Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema sp.* and *Phaeodactylum tricornutum*.

UNI EN ISO 11885:2009. Determinazione di alcuni elementi mediante spettrometria di emissione ottica al plasma accoppiato induttivamente.

SVILUPPO DI “MAPPE (ECO)TOSSICOLOGICHE” E LORO APPLICAZIONE NEL RISK ASSESSMENT DEL FIUME LEDRA

G. Raitano^{a,}, D. Gol^a, V. Pieri^a, A. Passoni^a, M. Mattiussi^b, A. Lutmar^c, I. Romeo^c, A. Manganaro^c, M. Marzò^c, N. Porta^c, D. Baderna^c, A. Colomba^c, E. Aneggi^d, F. Natalino^d, M. Lodi^e, R. Bagnati^e, E. Benfenati^e*

^a Dipartimento Ambiente e Salute, IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano; *giuseppa.raitano@marionegri.it

^b Dipartimento Politecnico di Ingegneria e Architettura, Università di Udine, Udine;

^c Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità ambientale, Università di Parma, Parma;

^d ARPA FVG, Udine

^e Dipartimento di Chimica, Fisica e Ambiente, Università di Udine, Udine

Abstract - Diversi inquinanti chimici emergenti, sono spesso rilevati nelle acque reflue e sono successivamente riscontrabili nei corpi idrici a seguito dell'immissione delle acque depurate. Tuttavia, la conoscenza dei loro effetti [eco]tossicologici e del conseguente impatto sulla salute umana è ancora limitata. Nello studio qui presentato, l'uso di metodi in silico integrati con l'analisi del rischio tossicologico tradizionale è proposto come valido approccio per superare questa carenza di informazione. L'integrazione così concepita ha permesso l'elaborazione di un nuovo metodo di valutazione del rischio globale che combina la valutazione dei rischi per la salute umana ed ecologica nell'area oggetto di studio. Il rischio [eco]tossicologico è espresso da un singolo valore numerico, permettendo il confronto tra diversi siti di campionamento e la valutazione di futuri interventi ambientali e tecnici.

Keywords: [Q]SAR, metodi in silico, valutazione del rischio ambientale, CECs, strategia di integrazione, impianto di trattamento delle acque reflue.

Introduzione

Contaminanti emergenti (CECs), come prodotti farmaceutici, prodotti per la cura personale, pesticidi e sostanze chimiche dannose per il sistema endocrino (EDCs) sono stati rilevati nelle acque reflue, come riportato in letteratura, ma si sa poco dei loro effetti ecotossicologici. È necessaria una conoscenza molto più dettagliata di questi inquinanti e dei loro effetti al fine di pianificare interventi mirati e di migliorare le prestazioni degli strumenti odierni.

Il presente lavoro mira a fornire uno schema per una valutazione complessiva delle proprietà [eco] tossicologiche e ambientali, in vista di una nuova combinazione della gestione delle risorse idriche e della conservazione dell'ambiente e della salute in cicli idrici coerenti e integrati. Il progetto si basa sulle caratteristiche tossicologiche del fiume Ledra, in Italia, che ha un impatto ambientale modesto, al fine di trovare un metodo robusto per valutare l'inquinamento residuo, basato su un singolo indice [eco] tossicologico che combina la rilevazione di molteplici contaminanti che hanno diversi comportamenti ambientali, proprietà [eco] tossicologiche e concentrazioni. Questo approccio, una volta ottimizzato su questo fiume, può essere applicato ad altri corpi idrici.

In questo studio abbiamo ottimizzato e applicato l'indice ERICA (Environmental Risk Index for Chemicals Assessment), concentrandoci sulla valutazione del rischio tossicologico e ambientale di una miscela di contaminanti, assumendo un destino statico ambientale degli inquinanti solo nel compartimento dell'acqua. L'ottimizzazione ha coinvolto lo sviluppo e l'uso di metodi in silico robusti/consistenti, da applicare in mancanza di dati sperimentali. Abbiamo utilizzato diversi modelli, specifici per la valutazione ambientale e umana, e sviluppato alcuni nuovi modelli ad hoc. I metodi in silico sono pensati per colmare le lacune di dati sperimentali attraverso un approccio che riduce tempi e costi. Il loro uso è incoraggiato in molti contesti.

L'indice integrato del rischio tossicologico legato alla qualità dell'acqua (IRW), ottenuto con questa nuova strategia di valutazione del rischio globale, descrive lo stato generale di salute del fiume Ledra, "fotografato" in mappe (eco) tossicologiche.

Materiali e metodi

L'area di studio copre l'intero bacino del fiume Ledra (21 km di lunghezza), situato nella regione Friuli-Venezia Giulia (Italia). Questa area è caratterizzata dalla presenza di molti impianti di trattamento delle acque reflue. Nel mese di maggio 2015 sono stati selezionati un totale di 15 stazioni di campionamento, a monte e a valle dei punti di scarico delle acque reflue. Le analisi in HPLC-MS sono state condotte dall'Istituto di ricerche Farmacologiche Mario Negri e dall'Arpa di Udine.

I dati sperimentali sono stati ricercati in diverse fonti (databases accreditati internazionalmente e in letteratura) e selezionati in base alla loro conformità con le linee guida ufficiali OECD.

Per la parte ambientale sono stati trovati dati sperimentali in acuto/cronico di alghe, dafnidi e pesci. Valori di Acceptable daily intake (ADI) e chronic/oral reference dose (RfD) sono state cercati per la valutazione della tossicità non cancerogena e quelli di slope factor (SF) per quella cancerogena. Per quei composti di cui non sono stati trovati dati sperimentali adeguati, le informazioni necessarie sono state integrate con i valori delle predizioni dei seguenti modelli QSAR (vedi tabella 1)

Tabella 1. Elenco dei modelli (Q)SAR già disponibili usati per la valutazione ecotossicologica degli inquinanti.

Endpoints	Platform	Modelli
Algae, <i>Daphnia magna</i> and fish, acute and chronic toxicity	EPI Suite™	ECOSAR v.1.1.1
Fish acute toxicity (LC50 96h)	T.E.S.T.	Consensus method
	VEGA	Fish acute (LC50) toxicity model [k-NN/read-across] v.1.0.0
Fathead minnow LC50 96h (EPA) v.1.0.7		
<i>Daphnia magna</i> 48h (EPA) v 1.0.7		
<i>Daphnia magna</i> acute toxicity (EC50 48h)	T.E.S.T.	<i>Daphnia magna</i> 48h (Demetra) v. 1.0.4
		Consensus method

Inoltre, per aumentare l'affidabilità delle stesse, le predizioni sono state integrate in un sistema di consensus validato.

Mancando sia i dati sperimentali che i modelli predittivi, per la valutazione umana è stato necessario sviluppare due nuovi modelli QSAR: un nuovo metodo integrato di 5 modelli k-Nearest Neighbor (k-NN) in regressione per la predizione di RfDs (tossicità umana non cancerogena) e un nuovo modello per la predizione dei valori di Slope Factors (tossicità cancerogena).

La valutazione del rischio ecologico si è articolata secondo i seguenti steps:

-Calcolo delle PNEC per i singoli composti;

-Calcolo di un indice di qualità per ogni composto secondo la seguente equazione:

$$EQ = \frac{\text{conc. rilevata della sostanza}}{\text{PNEC per alghe, daphnidi e pesci}}$$

-Calcolo di un indice di qualità cumulativo per ogni sito di campionamento secondo la seguente equazione:

$$EQ\ cum = \sum \text{singoli EQ per ogni sito di campionamento}$$

Di contro, la valutazione del rischio per la salute umana (cancerogeno e non) ha considerato 5 diversi scenari espositivi possibili e si è basato sui seguenti calcoli:

-Calcolo della Chronic Daily Intake (CDI) per ogni singolo composto secondo la seguente equazione:

$$CDI = C \times \frac{IR \times EF \times ED}{BW \times AT \times CF}$$

-Calcolo di un indice di qualità per la tossicità non cancerogena per ogni singolo composto secondo la seguente equazione:

$$HQ = \frac{CDI}{RfD\ o\ ADI}$$

-Calcolo di un indice di qualità per la tossicità cancerogena per ogni singolo composto secondo la seguente equazione:

$$ILCR = CDI \times SF$$

- Calcolo dei precedenti indici di qualità cumulativi per ogni sito di campionamento secondo le seguenti equazioni:









$$HQ\ cum = \sum \text{singoli HQ per ogni sito di campionamento}$$

$$ILCR\ cum = \sum \text{singoli CR per ogni sito di campionamento}$$

Ogni indice cumulativo di tossicità (EQc, HQc and ILCRc) è stato pesato alla luce dei diversi livelli di contaminazione. A seconda del range di riferimento in cui vengono a cadere, i valori sono stati tradotti in una scala numerica continua da un metodo di scoring interno.

Ad ogni livello di score corrisponde un rischio potenziale e un giudizio sulla qualità delle acque; i diversi colori associati rendono più intuitiva la situazione determinata attraverso l'analisi e la fotografano in una "mappa di (eco)tossicità".

Tabella 2. Tabella del potenziale di valutazione del rischio e del giudizio sulla qualità delle acque ad esso legato per l'interpretazione delle "mappe [eco]tossicologiche.

EQ e HQ	ILCR	Range score	Potenziale di valutazione del rischio	Qualità delle acque superficiali	colori
<0.1	<10 ⁻⁶	<0.25	da Trascurabile a Molto Basso	da Molto Buona a Buona	
0.1-1	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁵	0.25 - 0.5	da Molto Basso a Basso	da Buona a Moderata	
1	10 ⁻⁵	0.5 - 1	da Basso a Moderato	da Moderata a Insalubre per i gruppi sensibili	
1-5	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴	1 - 1.50	da Moderato a Rilevante	da Insalubre per i gruppi sensibili a Insalubre	
5-10	10 ⁻⁴ -10 ⁻³	1.5 - 2	da Rilevante a Molto Rilevante	da Insalubre a Molto Insalubre	
10-100	10 ⁻³ -10 ⁻²	2 - 3	da Molto Rilevante ad Alto	da molto Insalubre a Cattiva	
100-1000	10 ⁻² -10 ⁻¹	3 - 4	da Alto a Molto Alto	da Cattiva a Molto Cattiva	
>1000	>10 ⁻¹	≥4	Pericoloso	Pessima	

L'indice integrato di rischio [eco] tossicologico relativo alla qualità delle acque (IRW) è il risultato del contributo di ognuno dei precedenti indici in uguale misura per ogni scenario di esposizione ipotizzato come si vede dalla equazione seguente.

$$IRW = \frac{\sum_{i=1}^5 [(EQc\ score + HQc\ score + ILCRc\ score) \times 100 / 24]_i}{5}$$

Risultati

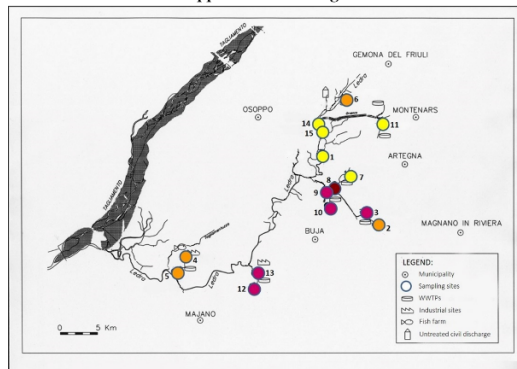
Le analisi in HPLC-MS hanno permesso di identificare e quantificare 47 sostanze di cui 19 farmaci, 21 pesticidi e 7 droghe da abuso.

Rispetto agli altri, quattro siti di campionamento (numeri. 3, 8, 12 e 13) presentano concentrazioni totali di analiti trovati più alte (>1000ng/L).

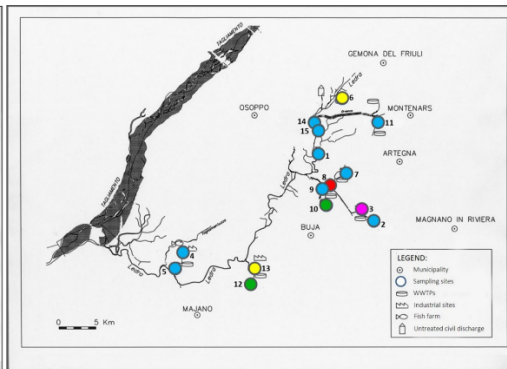
Grazie all'integrazione delle predizioni dei modelli (Q)SAR (nuovi e già disponibili), sono state calcolate le PNEC e le CDI di tutti e 47 i contaminanti e di conseguenza gli indici cumulativi di qualità [eco] tossicologica e l'indice integrato di rischio tossicologico correlato alla qualità dell'acqua (IRW).

Di seguito vengo riportate 3 mappe [eco] tossicologiche risultanti dal nuovo metodo integrato di valutazione del rischio descritto. La mappa eco-tossicologica fotografa la situazione dell'impatto dei contaminanti a livello ambientale; i diversi colori palesano quali sono i siti più critici così come fanno nella mappa tossicologica in relazione al possibile rischio per la salute umana. L'ultima restituisce entrambe quelle informazioni dando una visione globale della situazione dell'area studiata.

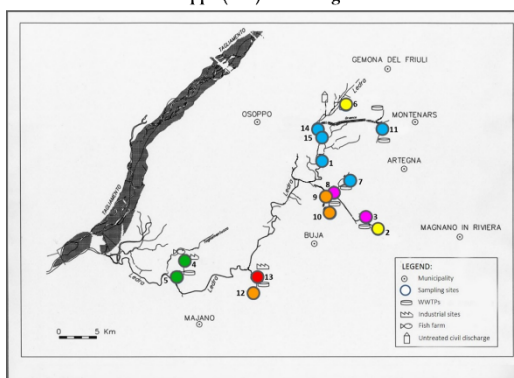
Mappa eco-tossicologica



Mappa tossicologica



Mappa (eco)tossicologica



Discussione e conclusioni

Le predizioni dei modelli QSAR si sono dimostrate particolarmente preziose nel caso dei farmaci e delle droghe per i quali mancavano dati (eco) tossicologici.

I tre indici (EQ, HQ e ILCR) hanno contribuito a determinare l'indice integrato di rischio tossicologico correlato alla qualità dell'acqua (IRW).

Per ciascun sito di campionamento, l'IRW è stato associato a una valutazione del rischio potenziale che tiene conto di tutti e cinque gli scenari di esposizione.

L'indice globale IRW fornisce un quadro generale completo della situazione (eco) tossicologica del fiume Ledra, illustrata nelle mappe di (eco) tossicologia.

Identificando e caratterizzando le parti critiche di quest'area, l'indice è uno strumento utile per pianificare azioni future al fine di migliorare i sistemi di scarico coinvolti.

Ringraziamenti

Si ringraziano la "CONSULTA DI BACINO DEL FIUME LEDRA" e i colleghi Francesco Riva, Federico Teoldi, Sara Castiglioni ed Ettore Zuccato del Dipartimento di Ambiente e Salute per il loro aiuto e incoraggiamento

Bibliografia

Raitano et al. 2018 "[Eco]toxicological maps: A new risk assessment method integrating traditional and *in silico* tools and its application in the Ledra River (Italy), DOI: 10.1016/j.envint.2018.06.035

