

III^a Giornata di Ecotossicologia Applicata

Metodi ecotossicologici:

verso criteri di valutazione comuni per ambiti diversi

22-23 Novembre 2023

ISPRA – Via del Cedro 38 - 57122 Livorno

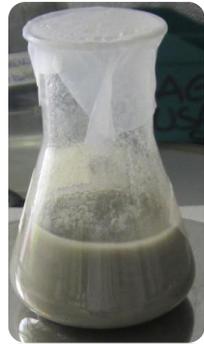
***Confronto elutriazione (1:4 e 1:10) per la valutazione della
tossicità della componente liquida del sedimento:***

Prove preliminari su sedimenti della laguna di Orbetello

Andrea Tornambè, Davide Sartori (ISPRA) e Veronica Piazza (IAS-CNR)



PREPARAZIONE ELUTRIATO



0,22 µm FNSW

Acqua ISO

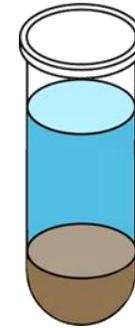
1:4 e 1:10
(S/W)



Stirring
(1h a 20°C)

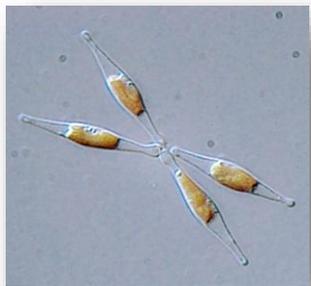


Centrifuga (20' a 3000 rpm)

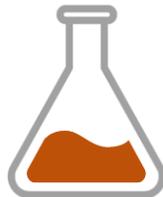


Surnatante
(100%
elutriato)

Test di Alterazione della crescita algale con *Phaeodactylum tricornutum* UNI EN ISO 10253 (2016)



P. tricornutum



10⁵ cell/ml



10⁴ cell/ml

3/6 repliche



Elutriato
(100%)



72 h

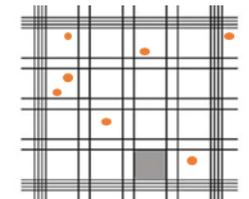


20 °C



Luce

🎯 % Alterazione della
crescita algale



Camera di Burker



Coulter Counter Z1

Elutriato 1:4

72h Campioni	Elutriato 1:4 (FNSW)	
	% effetto elutriato non diluito (tal quale,100%)	EC50
DOS 1	7,0	nc (>100%)
DOS 2	1,0	nc (>100%)
DOS 3	6,0	nc (>100%)
DOS 4	-3,0	nc (>100%)
DOS 5	8,0	nc (>100%)
DOS 7	-2,0	nc (>100%)
DOS 8	12,0	nc (>100%)
DOS 9	11,0	nc (>100%)
DOS 10	29,0	nc (>100%)
DOS 11	22,0	nc (>100%)
DOS 12	15,0	nc (>100%)
DOS 13	15,0	nc (>100%)
DOS 14	-9,0	nc (>100%)
DOS 15	10,0	nc (>100%)
DOS 16	-3,0	nc (>100%)

0,22 µm FNSW

Elutriato 1:10

72h Campioni	Elutriato 1:10 (FNSW)	
	% effetto elutriato non diluito (tal quale,100%)	EC50
DOS 1	12,0	nc (>100%)
DOS 2	6,0	nc (>100%)
DOS 3	7,0	nc (>100%)
DOS 4	15,0	nc (>100%)
DOS 5	13,0	nc (>100%)
DOS 7	6,0	nc (>100%)
DOS 8	4,0	nc (>100%)
DOS 9	-1,0	nc (>100%)
DOS 10	-3,0	nc (>100%)
DOS 11	1,0	nc (>100%)
DOS 12	12,0	nc (>100%)
DOS 13	9,0	nc (>100%)
DOS 14	9,0	nc (>100%)
DOS 15	-5,0	nc (>100%)
DOS 16	-4,0	nc (>100%)

Acqua ISO

72h Campioni	Elutriato 1:4 (Acqua ISO)	
	% effetto elutriato non diluito (tal quale,100%)	EC50
DOS 1	-2,0	nc (>100%)
DOS 2	-12,2	nc (>100%)
DOS 3	5,5	nc (>100%)
DOS 4	-7,1	nc (>100%)
DOS 5	-15,8	nc (>100%)
DOS 7	-14,3	nc (>100%)
DOS 8	-10,3	nc (>100%)
DOS 9	-16,7	nc (>100%)
DOS 10	-9,8	nc (>100%)
DOS 11	-12,0	nc (>100%)
DOS 12	-5,8	nc (>100%)
DOS 13	-9,9	nc (>100%)
DOS 14	-7,7	nc (>100%)
DOS 15	-0,9	nc (>100%)
DOS 16	-1,5	nc (>100%)

72h Campioni	Elutriato 1:10 (Acqua ISO)	
	% effetto elutriato non diluito (tal quale,100%)	EC50
DOS 1	-1,0	nc (>100%)
DOS 2	2,0	nc (>100%)
DOS 3	-11,0	nc (>100%)
DOS 4	-8,0	nc (>100%)
DOS 5	-6,0	nc (>100%)
DOS 7	-13,0	nc (>100%)
DOS 8	6,0	nc (>100%)
DOS 9	3,0	nc (>100%)
DOS 10	-12,0	nc (>100%)
DOS 11	-9,0	nc (>100%)
DOS 12	0	nc (>100%)
DOS 13	-6,0	nc (>100%)
DOS 14	4,0	nc (>100%)
DOS 15	4,0	nc (>100%)
DOS 16	3,0	nc (>100%)

Elutriato 1:4

0,22 µm FNSW

	FNSW		
	Elutriato 1:4	Media % effetto	dev st
DOS 1	Stimolazione*	-2,12	1,28
DOS 2	NS	1,82	2,51
DOS 3	NS	1,97	3,65
DOS 4	Stimolazione**	-4,08	1,68
DOS 5	NS	-2,11	3,52
DOS 7	NS	-1,49	2,09
DOS 8	NS	1,34	3,19
DOS 9	NS	-0,95	1,49
DOS 10	Inibizione**	7,47	2,83
DOS 11	Stimolazione*	-7,09	4,80
DOS 12	Stimolazione*	-4,24	3,23
DOS 13	NS	-1,33	5,39
DOS 14	NS	1,15	1,20
DOS 15	Inibizione **	6,66	2,40
DOS 16	NS	-0,68	4,03

	ACQUA ISO		
	Elutriato 1:4	Media % effetto	dev st
DOS 1	NS	-3,58	5,65
DOS 2	Stimolazione **	-6,86	3,08
DOS 3	Stimolazione **	-5,99	3,01
DOS 4	NS	-0,27	3,45
DOS 5	NS	-2,07	4,71
DOS 7	Inibizione *	5,12	3,12
DOS 8	Stimolazione **	-7,98	1,05
DOS 9	Stimolazione **	-11,35	1,94
DOS 10	Stimolazione **	-9,28	1,79
DOS 11	NS	-2,78	1,55
DOS 12	Stimolazione *	-4,45	1,26
DOS 13	Stimolazione**	-6,65	2,57
DOS 14	NS	-2,87	4,53
DOS 15	NS	-3,53	4,21
DOS 16	NS	-3,11	3,12

Acqua ISO

Elutriato 1:10

	FNSW		
	Elutriato 1:10	Media % effetto	dev st
DOS 1	Inibizione**	13,60	3,11
DOS 2	Inibizione**	6,33	5,93
DOS 3	Inibizione**	10,45	3,58
DOS 4	Inibizione**	7,91	1,62
DOS 5	NS	1,32	2,73
DOS 7	Inibizione**	8,56	1,35
DOS 8	Inibizione**	7,21	1,76
DOS 9	Inibizione**	5,53	2,10
DOS 10	NS	0,26	2,25
DOS 11	NS	1,76	4,57
DOS 12	NS	-0,20	0,97
DOS 13	NS	0,95	2,00
DOS 14	NS	-6,14	8,94
DOS 15	Stimolazione*	-6,78	4,41
DOS 16	Stimolazione**	-9,58	0,81

	ACQUA ISO		
	Elutriato 1:10	Media % effetto	dev st
DOS 1	Inibizione **	3,31	1,54
DOS 2	Stimolazione **	-2,10	0,78
DOS 3	NS	-0,17	2,26
DOS 4	NS	0,98	2,71
DOS 5	Stimolazione*	-1,71	0,63
DOS 7	Stimolazione**	-6,66	1,06
DOS 8	Stimolazione *	-4,06	3,48
DOS 9	NS	-1,57	1,70
DOS 10	Stimolazione **	-3,25	1,17
DOS 11	Stimolazione **	-5,30	1,44
DOS 12	Stimolazione **	-5,62	2,13
DOS 13	Stimolazione **	-5,79	0,81
DOS 14	NS	-1,67	1,88
DOS 15	Stimolazione *	-6,16	3,68
DOS 16	NS	-5,75	7,57

SAGGIO CON *P. tricornutum* - CONCLUSIONI

Test eseguito su elutriato 1:4 e 1:10 con due tipologie di acqua (FNSW e ISO) da due laboratori (CNR IAS e ISPRA)

- Elutriati preparati con **acqua ISO: stimolazione della crescita algale** (effetto > 10 % soglia di significatività per DM 173)

<u>Elutriati 1:4</u>	per 6 campioni (su 15) secondo dati CNR per 1 campione (su 15) secondo dati ISPRA
<u>Elutriati 1:10</u>	per 3 campioni (su 15) secondo dati CNR per 0 campioni (su 15) secondo dati ISPRA

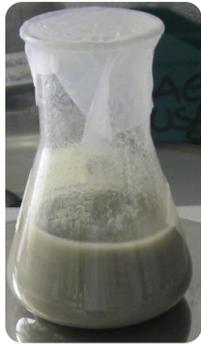
- Elutriati preparati con **acqua naturale FNSW: lieve effetto di inibizione della crescita algale** soprattutto per i campioni CNR (effetto > 10 % - soglia di significatività per DM 173):

<u>Elutriati 1:4</u>	per 6 campioni (su 15) secondo dati CNR per 0 campioni (su 19) secondo dati ISPRA
<u>Elutriati 1:10</u>	per 4 campioni (su 15) secondo dati CNR per 2 campioni (su 15) secondo dati ISPRA

In generale blandi effetti di tossicità/stimolazione

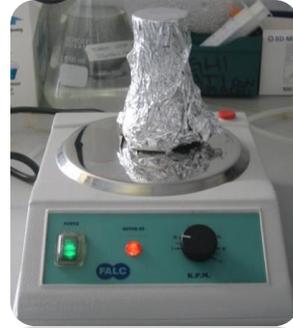
Differenze NON significative di effetto tra elutriati 1:4 ed 1:10

PREPARAZIONE ELUTRIATO



1:4 e 1:10
(S/W)

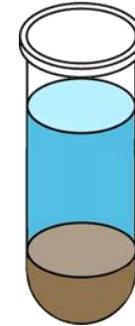
0,22 μ m FNSW



Stirring
(1h a 20°C)

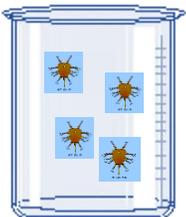


Centrifuga (20' a 3000 rpm)



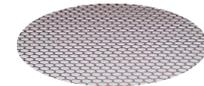
Surnatante
(100%
elutriato)

Test di tossicit  con nauplii di *Amphibalanus amphitrite* N.U. 2245-2011



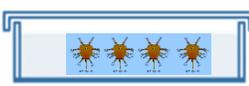
15-20 organismi/ml

1 ml di organismi



Filtro (maglia 80 μ m)

Elutriato
(12.5-25-50-100%)



4 repliche



24/48 h



20 $^{\circ}$ C



buio

% Mortalit 

% Immobilit 

% Alterazione del nuoto
(SSA)



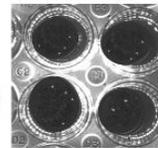
Swimming Behavioral Recorder (SBR) system



IR source



Software



Multiwell plate with organisms



Swimming speed measure
(frames/sec)
Or
Frequency of pulsations
(pulsation number/min)

Behavioral
Alteration \rightarrow EC50

SAGGIO CON *A. amphitrite*



0,22 µm FNSW

elutriato 1:4

elutriato 1:10

Tempo di esposizione: **48 ore**

1:4

1:10

48h	Elutriato 1:4				
	% effetto elutriato non diluito (tal quale,100%)			EC50 (48h)	
Sigla Campione	Mortalità (%)	Immobilità (%)	Nuoto (%)	Immobilità	Nuoto
DOS 1	7	18,2	-31,0	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 2	10,6	48,0	-44,3	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 3	8,5	46,1	-58,9	nc (>100%)	60,59(34,67-105,85)
DOS 4	12	37,6	-40,6	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 5	16,2	24,9	-29,7	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 7	18,8	59,5	-80,7	79,4 (60,8-103,6)	53,2 (45,6-62,0)
DOS 8	9,8	33,2	-34,9	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 9	6,1	21,6	-36,2	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 10	36,6	59,8	-70,4	23,4 (12,7-43,3)	<12,5%
DOS 11	14,0	28,6	-43,7	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 12	20,0	36,0	-54,1	nc (>100%)	77,7(49,1-123,1)
DOS 13	14,2	23,1	-37,1	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 14	15,0	40,7	-53,1	nc (>100%)	59,2 (13,8-254,0)
DOS 15	15,2	23,9	-55,9	nc (>100%)	35,4 (15,1-83,1)
DOS 16	14,9	32,4	-50,31	nc (>100%)	100 (nc)

48h	Elutriato 1:10				
	% effetto elutriato non diluito (tal quale,100%)			EC50 (48h)	
Sigla Campione	Mortalità (%)	Immobilità (%)	Nuoto (%)	Immobilità	Nuoto
DOS 1	3	15	-15,6	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 2	1	11,2	-18,5	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 3	2	10	-32,0	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 4	1	9	-18	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 5	6,5	14,5	-24,1	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 7	6,7	15,7	-26,3	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 8	0	7,6	-12,6	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 9	2	7	-18,2	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 10	10,7	26,7	-39,0	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 11	2	14	-24,9	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 12	2,5	4,5	5	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 13	0	9,8	-11,4	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 14	5	9	-13,9	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 15	3	7	-16,6	nc (>100%)	nc (>100%)
DOS 16	16	16	-35,3	nc (>100%)	nc (>100%)

- NEI TEST ESEGUITI SU ELUTRIATO 1:4 SI EVIDENZIA UN EFFETTO DI TOSSICITA' MAGGIORE RISPETTO AI TEST SU ELUTRIATO 1:10 (come è logico aspettarsi...)
- coerentemente con quanto riportato nel “Quaderno ISPRA 16/2021 - Aspetti metodologici finalizzati all’applicazione dei saggi biologici previsti dall’allegato tecnico al DM 173/16: protocollo per la preparazione dell’elutriato»

una miscela acqua-sedimento molto concentrata, quale quella ottenuta con un **rapporto 1:4** peso/volume (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 4 parti di acqua misurate in volume), è **maggiormente associabile alla rilevazione di effetti a breve termine o acuti**; un rapporto a maggiore diluizione, quale 1:10 (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 10 parti di acqua misurate in volume), è più associabile con la rilevazione di effetti a lungo termine o cronici e rappresenta l’approccio più adatto, nell’ambito della classificazione e nella gestione della risorsa sedimento, per una simulazione del rilascio dei contaminanti nella colonna d’acqua durante le attività di movimentazione



ASPETTI METODOLOGICI FINALIZZATI
ALL'APPLICAZIONE DEI SAGGI BIOLOGICI
PREVISTI DALL'ALLEGATO TECNICO
AL D.M. 173/16: PROTOCOLLO
PER LA PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO
QUADERNI DI ECOTOSSICOLOGIA

PREPARAZIONE ELUTRIATO



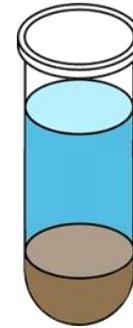
Acqua Instant Ocean®



Stirring
(1h a 20°C)



Centrifuga (20' a 3000 rpm)



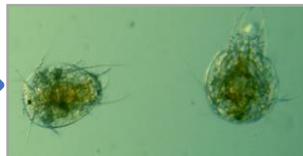
Surnatante
(100%
elutriato)

1:4 e 1:10
(S/W)

Test di tossicità con nauplii di *Tigriopus fulvus* UNICHIM 2396-2014

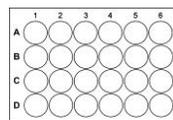


Allevamento



Selezione nauplii

Elutriato
(100%)



4 repliche



48/96 h



20 °C



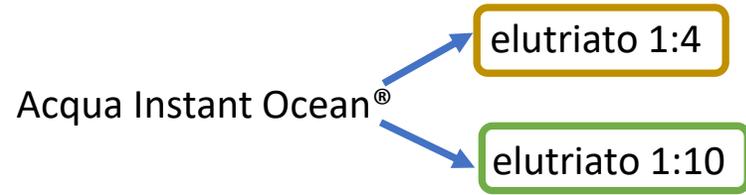
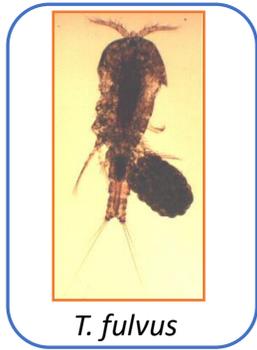
14h L : 8h B

% Immobilità

% Mute



SAGGIO CON *T. fulvus*



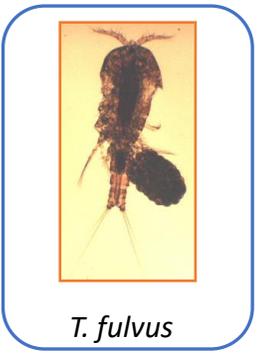
1:4

<i>T. fulvus</i> 96 h					
Campione		Media sopravvivenza	d.s	Δ % inibizione mute	d.s.
1 a 4	DOS 01	100	0	-2,22	7,70
1 a 4	DOS 02	100	0	22,22	3,85
1 a 4	DOS 03	100	0	-13,33	17,64
1 a 4	DOS 04	100	0	-11,11	16,78
1 a 4	DOS 05	100	0	6,67	6,67
1 a 4	DOS 07	100	0	-26,67	6,67
1 a 4	DOS 08	100	0	-2,22	10,18
1 a 4	DOS 09	100	0	-17,78	13,88
1 a 4	DOS 10	100	0	-20,00	6,67
1 a 4	DOS 11	100	0	-2,22	3,85
1 a 4	DOS 12	96,67	5,77	-22,22	3,85
1 a 4	DOS 13	100	0	-8,89	10,18
1 a 4	DOS 14	100	0	-6,67	0,00
1 a 4	DOS 15	100	0	-4,44	7,70
1 a 4	DOS 16	100	0	-11,11	7,70

Tempo di esposizione: **96 ore**

1:10

<i>T. fulvus</i> 96 h					
Campione		Media sopravvivenza	d.s.	Δ % inibizione mute	d.s.
1 a 10	DOS 01	100	0	-11,11	7,70
1 a 10	DOS 02	100	0	-65,22	3,77
1 a 10	DOS 03	100	0	-80,43	6,52
1 a 10	DOS 04	100	0	-65,22	3,77
1 a 10	DOS 05	100	0	-65,22	3,77
1 a 10	DOS 07	100	0	-69,57	3,77
1 a 10	DOS 08	100	0	-80,43	0,00
1 a 10	DOS 09	100	0	-80,43	0,00
1 a 10	DOS 11	100	0	11,11	10,18
1 a 10	DOS 12	100	0	-80,43	0,00
1 a 10	DOS 13	100	0	-78,26	3,77
1 a 10	DOS 14	100	0	-4,44	3,85
1 a 10	DOS 15	100	0	-15,56	3,85
1 a 10	DOS 16	100	0	-6,67	6,67



- In generale per tutti gli elutriati (1:4 e 1:10) non si evidenziano effetti di tossicità acuta
- Si registrano invece **effetti evidenti subletali (inibizione del tasso di mute)** soprattutto nei campioni **1:10**
- Anche questo potrebbe essere coerente con quanto riportato nel “*Quaderno ISPRA 16/2021 - Aspetti metodologici finalizzati all’applicazione dei saggi biologici previsti dall’allegato tecnico al DM 173/16: protocollo per la preparazione dell’elutriato*» se consideriamo il tasso di mute come endpoint «cronico»

una miscela acqua-sedimento molto concentrata, quale quella ottenuta con un **rapporto 1:4** peso/volume (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 4 parti di acqua misurate in volume), è **maggiormente associabile alla rilevazione di effetti a breve termine o acuti**; un **rapporto a maggiore diluizione, quale 1:10** (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 10 parti di acqua misurate in volume), è **più associabile con la rilevazione di effetti a lungo termine o cronici** e rappresenta l’approccio più adatto, nell’ambito della classificazione e nella gestione della risorsa sedimento, per una simulazione del rilascio dei contaminanti nella colonna d’acqua durante le attività di movimentazione



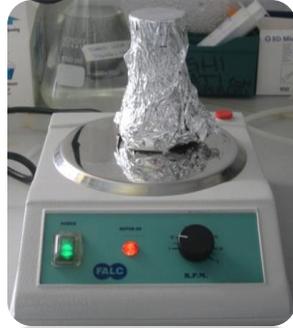
ASPETTI METODOLOGICI FINALIZZATI
ALL'APPLICAZIONE DEI SAGGI BIOLOGICI
PREVISTI DALL'ALLEGATO TECNICO
AL D.M. 173/16: PROTOCOLLO
PER LA PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO
QUADERNI DI ECOTOSSICOLOGIA

PREPARAZIONE ELUTRIATO



1:4 e 1:10
(S/W)

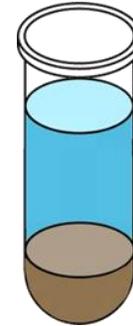
0,22 μm FNSW



Stirring
(1h a 20°C)

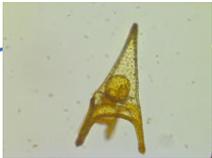


Centrifuga (20' a 3000 rpm)



Surnatante
(100%
elutriato)

Saggio di embriotossicità con *Paracentrotus lividus*



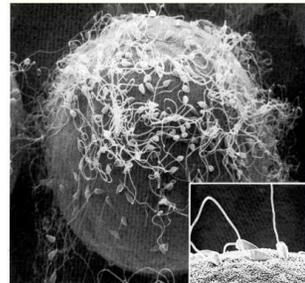
SAGGIO DI FECONDAZIONE
E SAGGIO DI SVILUPPO EMBRIONALE
CON IL RICCIO DI MARE
PARACENTROTUS LIVIDUS (LAMARCK)
(ECHINODERMATA: ECHINOIDEA)
Quaderni di Ecotossicologia

RICERCA MARINA

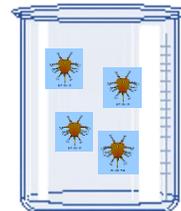
Quaderni



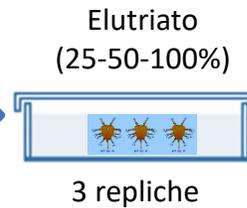
Recupero gameti



fecondazione



≈ 1000 zigoti/ml



Elutriato
(25-50-100%)

3 repliche



72 h



18 °C



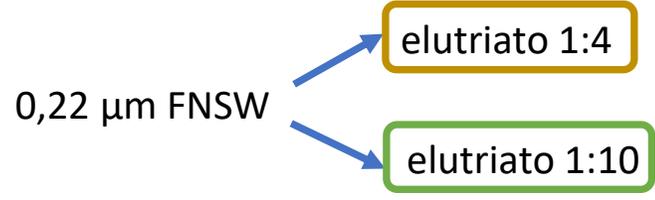
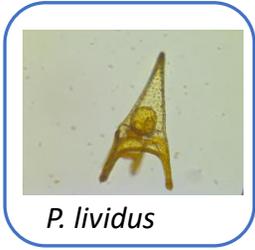
buio



% Plutei malformati



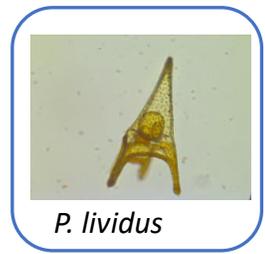
Saggio di embriotossicità con *P. lividus*



Tempo di esposizione: **72 ore**

Sigla Campione	Media P4 Normoformati	ds	EC20/EC50	
			EC20	EC50
DOS01	64.00	2.65	84.32	>100
DOS02	64.00	1.73	88.64	>100
DOS03	80.00	1.00	>90	>90
DOS04	78.67	1.15	>90	>90
DOS05	79.33	2.08	>90	>90
DOS07	0.00	0.00	12.7	15.6
DOS08	78.33	3.06	>90	>90
DOS09	9.67	1.53	15.8	19.8
DOS10	44.00	4.36	76.59	>100
DOS11	79.67	2.52	>90	>90
DOS12	79.00	2.65	>90	>90
DOS13	80.33	1.53	>90	>90
DOS14	80.33	3.21	>90	>90
DOS15	24.00	3.00	51.64	60.36
DOS16	39.33	2.08	74.05	>100

Sigla Campione	Media P4 Normoformati	ds	EC20/EC50	
			EC20	EC50
DOS01	68.33	1.53	>90	>90
DOS02	79.67	0.58	>90	>90
DOS03	80.00	1.00	>90	>90
DOS04	77.00	2.65	>90	>90
DOS05	79.00	2.00	>90	>90
DOS07	81.00	1.00	>90	>90
DOS08	78.00	2.65	>90	>90
DOS09	78.00	2.65	>90	>90
DOS10	78.00	2.65	>90	>90
DOS11	78.33	2.89	>90	>90
DOS12	80.67	1.53	>90	>90
DOS13	77.33	1.53	>90	>90
DOS14	76.33	3.06	>90	>90
DOS15	77.33	3.06	>90	>90
DOS16	77.67	2.08	>90	>90



- NEI TEST ESEGUITI SU **ELUTRIATI 1:4** SI EVIDENZIANO EFFETTI TOSSICI in circa la metà dei campioni
- EFFETTI TRASCURABILI NEGLI ELUTRIATI 1:10
- Coerente con le indicazioni riportate nel *Quaderno ISPRA 16/2021*
- *Le prime divisioni cellulari (formazione micromeri) sono tra le più sensibili alla presenza dei contaminanti e influenzano il corretto sviluppo della larva (Yamazaki et al. 2012; Gaion et al., 2013). Concentrazioni maggiori di contaminanti (rapporto elutriazione 1:4) influenzano maggiormente il corretto sviluppo larvale.*

una miscela acqua-sedimento molto concentrata, quale quella ottenuta con un rapporto 1:4 peso/volume (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 4 parti di acqua misurate in volume), è maggiormente associabile alla rilevazione di effetti a breve termine o acuti; un rapporto a maggiore diluizione, quale 1:10 (una parte di sedimento “tal quale” misurata in peso e 10 parti di acqua misurate in volume), è più associabile con la rilevazione di effetti a lungo termine o cronici e rappresenta l’approccio più adatto, nell’ambito della classificazione e nella gestione della risorsa sedimento, per una simulazione del rilascio dei contaminanti nella colonna d’acqua durante le attività di movimentazione



ASPETTI METODOLOGICI FINALIZZATI
ALL'APPLICAZIONE DEI SAGGI BIOLOGICI
PREVISTI DALL'ALLEGATO TECNICO
AL D.M.173/16: PROTOCOLLO
PER LA PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO

QUADERNI DI ECOTOSSICOLOGIA

In conclusione.....

- Il saggio con *P. tricornutum* ha mostrato una bassa sensibilità per entrambi gli elutriati (1:4 e 1:10), per tutti i campioni
- Per i test di Tipologia 2 (Allegato Tecnico al DM 173/2016):

A. amphitrite maggiore tossicità per elutriato 1:4 Vs 1:10 (in particolare evidente su end-point subletale): coerente con indicazioni presenti nel Quaderno ISPRA 16/2021

T. fulvus maggiore tossicità per elutriato 1:10 Vs 1:4 (su end point «tasso di mute» a 96 h:risposta cronica)

- Per il saggio di Tipologia 3 :
P. lividus maggiore tossicità per elutriato 1:4 Vs 1:10
coerente con indicazioni presenti nel Quaderno ISPRA 16/2021

