

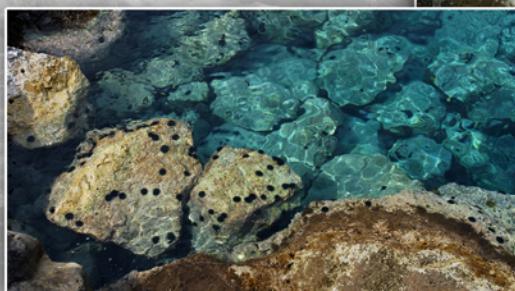


**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



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



## ATTI

Giornate di Studio  
5<sup>a</sup> Edizione

Livorno, 7- 9 Novembre 2012  
Fondazione Livorno Euro Mediterranea (L.E.M.)  
PIAZZA DEL PAMIGLIONE, 1/2 57123 LIVORNO



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



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

## **ATTI**

**Giornate di Studio  
5<sup>a</sup> Edizione**

**Livorno, 7- 9 Novembre 2012  
Fondazione Livorno Euro Mediterranea (L.E.M.)  
PIAZZA DEL PAMIGLIONE, 1/2 57123 LIVORNO**

## **Informazioni legali**

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa pubblicazione.

**ISPRA** - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale  
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma  
[www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)

ISPRA, Atti 2013  
ISBN 978-88-448-0614-9

Riproduzione autorizzata citando la fonte

## **Elaborazione grafica**

ISPRA

*Grafica di copertina:* Franco Iozzoli

*Foto di copertina:* Stefano Cellini e Paolo Orlandi

## **Coordinamento editoriale:**

Daria Mazzella

**ISPRA** - Settore Editoria

LUGLIO 2013

**A cura di**

Cristian Mugnai (ISPRA)

**Con il supporto di**

Isabella Buttino (ISPRA)

David Pellegrini (ISPRA)

# INDICE

---

<b>Presentazione</b>	p. 11
<b>Sessione A: criteri innovativi di indagine ecotossicologica</b>	p. 14
Nuovi approcci nella valutazione degli effetti subletali degli inquinanti in organismi modello caratteristici di differenti ecosistemi: dall'uso dei biomarker alla "system ecology" (A. Viarengo)	p. 15
The use of protists in ecotoxicology: application of multiple endpoint tests on the epibenthic, free crawling ciliate <i>E. crassus</i> for the evaluation of sediment quality in marine coastal ecosystems (A. Gomiero, A. Dagnino, A. Negri, S. Sforzini, A. Viarengo)	p. 16
Nuove metodologie per il monitoraggio ecogenotossicologico in ambienti di acque dolci: comet assay su <i>Daphnia magna</i> (A. Buschini, V. Pellegrini, G. Gorbi)	p. 26
Behavioural end-points in <i>Ruditapes philippinarum</i> exposed to contaminated sediments (V. Moschino, M. Cappello, L. Da Ros)	p. 32
Cryo-ecotest: a new tool for the ecotoxicological evaluation of aquatic environments (A. Fabbrocini, R. D'adamo, F. Del Prete, L. Langellotti, F. Rinna, R. Sessa, F. Silvestri, G. Villani, V. Vitiello and G. Sansone)	p. 36
Ephyra jellyfish as a new model for ecotoxicological bioassays (E. Costa, M. Beltrandi, E. Bongiovanni, F. Garaventa, G. Gnone, G. Greco, S. Lavorano, V. Mazzola, V. Piazza, M. Faimali)	p. 43

Sviluppo ed integrazione di analisi chimiche, di indici biotici, biologici, biochimici ed indagini ultrastrutturali per la valutazione dell'impatto ambientale di strutture offshore per l'estrazione di idrocarburi nelle zone marine costiere [A. Gomiero, A. Negri, A. De Biasi, L. Kozinkova, P. Polidori, E. Punzo, A. Santelli, P. Strafella, A. Spagnolo, M. Girasole, S. Dinelli, C. Nasci, A. Viarengo, G. Fabi] p. 50

Applicazione di innovativi saggi ecotossicologici per l'accertamento della sicurezza tossicologica nell'ambito del riutilizzo irriguo delle acque reflue [R. Caricato, M.G. Lionetto, E. Erroi, T. Schettino] p. 60

Using sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* embryos in marine pollution studies: genome-inspired assays [c. Della Torre, L. E. Shipp, T. Gokirmak, J. P. Campanale, I. Corsi, A. Hamdoun] p. 64

Application of PLHC-1 as in vitro bioassay for AH receptor active compounds in environmental matrices [A. Malysheva, C. Della Torre, I. Corsi, M. Mariottini, S. Focardi] p. 68

First data on the use of native algal strain from ecosistema filtro to detect the effect of phosphate on growth inhibition [V. Malavasi, M. Marignani, M.C. Loi] p. 71

Professional exposure to basaltic rocks: assessment with the Microtox® solid phase test [C. Ledda, V. Rapisarda, M. Zuccarello, R. Fallico, M. Fiore, M. Ferrante] p. 77

**Tavola rotonda 1: certificazione, accreditamento e prove interlaboratorio** p. 81

Gli strumenti per l'assicurazione della qualità del dato: schemi di certificazione e di accreditamento [E. Raso, M.G. Simeone, V. Ubaldi, M. Belli] p. 83

I principi della certificazione della buona pratica di laboratorio (BPL): un progetto di formazione a distanza (M.G. Simeone, V. Ubaldi, E. Raso, D. Antonietti, S. Loffredi) p. 88

L'attività di assicurazione della qualità dei dati del servizio di metrologia ambientale: un esempio di prova ecotossicologica interlaboratorio (A. Pati, S. Balzamo, S. Barbizzi, V. Bellaria, M. Belli, D. Conti, P. De Zorzi, T. Guagnini, C. Martone, A. Paina, V. Ubaldi) p. 95

An example of robustness evaluation during validation process of an ecotoxicological assay: limits and critical points (v. Piazza, M. Faimali, M. Aragno, R. Baudo, T. Leoni, D. Pellegrini, S. Ziantoni) p. 101

**Sessione B: argomenti emergenti in ecotossicologia: dai nanomateriali alla tossicogenomica** p. 107

Nanoecotoxicology: molecular approaches and model organisms (V. Matranga) p. 108

Titanium dioxide nanoparticles and abc transporters in marine mussels: trojan horse effect with cadmium and dioxin? (I. Corsi, C. Della Torre, S. Focardi) p. 110

In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in marine organisms. (M. Nigro, V. Stingo, I.V. Valentino, M. Bernardeschi, P. Guidi, V. Scarcelli, G. Frenzilli, L. Rocco) p. 115

Valutazione della genotossicità del TiO<sub>2</sub> nel modello sperimentale *Danio rerio* (Cyprinidae, teleostei) (I.V. Valentino, L. Rocco, V. Stingo) p. 121

Comparative effect of quantum dot nanoparticles on the growth of two marine microalgae (E. Salvadori, P. Cioni, E. Gabellieri, E. Morelli) p. 126

Ecotoxicological effects of ZnO nanoparticles in seawater. (S. Manzo, S. Buono, M. L. Miglietta, G. Rametta, G. Di Francia) p. 132

Ecotoxicological responses in marine mussels and polychaetes exposed to nanohorns (V. Moschino, N. Nesto, S. Barison, L. Fedele, F. Agresti, L. Colla, L. Da Ros) p. 134

Antifouling strategies and sustainability: ecotoxicity assessment of polymeric foul-release coatings (M. Oliva, E. Martinelli, G. Galli, G. Monni, C. Pretti) p. 139

Nano- TiO<sub>2</sub> ecotoxicity from a battery of marine organisms (D. Minetto, G. Libralato, A. Volpi Ghirardini) p. 143

*In vivo* assays to study the interaction between TiO<sub>2</sub> nanoparticles and immune cells of sea urchin *paracentrotus lividus* (A. Pinsino, V. Matranga) p. 148

Marine ecotoxicity of pristine graphene, a novel carbon nanometric material (M. Oliva, R. Di Pietro, G. Monni, C. Pomelli, C. Chiappe, C. Pretti) p. 152

**Sessione C: applicazioni del Manuale ISPRA (67/2011) sulle batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre** p. 161

Batterie per saggi ecotossicologici su acque interne. (R. Baudo) p. 162

Studio integrato sullo stato qualitativo degli ambienti di transizione. Caso di studio: la Palude di Cona (Laguna di Venezia, Italia) (M. Botter, F. Acri, V. Piazza, E. Lovero, F. Garaventa) p. 168



Effetti indotti su *V. fischeri*, *B. plicatilis* e *P. tricornutum* dall'esposizione a miscele di sostanze ad azione tossica in soluzioni di acqua di mare (M. Renzi, S. Fantoni, A. Giovani, S.E. Focardi) p. 175

Saggi ecotossicologici sulle acque dell'area interessata dal naufragio della nave Concordia (D. Pellegrini, I. Buttino, S. Canepa, D. Sartori, L. Morroni, G. Benedettini, R. Manzione, F. Vigna Guidi) p. 179

**Tavola rotonda 2: bandi e opportunità nazionali/internazionali in ambito ecotossicologico.** p. 186

Opportunità di finanziamento per la ricerca e l'innovazione in ambito ecotossicologico (G. Ciurlia, A. Toncini) p. 187

**Sessione D: ruolo dell'ecotossicologia nell'ecosostenibilità dei processi produttivi e nella definizione della pericolosità dei materiali (parametro H14)** p. 189

Toxicity testing for hazardous waste classification (H14 criterion): practical experiences (G. Persoone) p. 191

I rifiuti e la pericolosità per l'ambiente (H14): evoluzione normativa e quadro di riferimento (A. Paina, D. Conti, S. Balzamo, A. Pati, C. Martone). p. 194

Valutazione della pericolosità per l'ambiente dei rifiuti (H14): definizione della procedura analitica (D. Conti, S. Balzamo, A. Paina, A. Pati, C. Martone, V. Bellaria). p. 201

Approccio integrato chimico ed ecotossicologico per la gestione ambientale di un ecosistema fluvio-lagunare influenzato da processi industriali estrattivi (E. Bartolucci, N. Calace, M. Guerra, G. Moltedo, G. Mulas, F. Onorati) p. 208

Effluent from anaerobic treatment of organic waste: ecotoxicity study and reuse as microalgae medium (S. Buono, A.L. Langellotti, M. Massa, A. Martello, O. Pepe, V. Fogliano) p. 211

Ecotoxicology in environmental assessment: pilot project for pesticide potential vulnerability assessment of Natura 2000 sites (C. Jacomini, F. Araneo, V. Bellucci, P.M. Bianco, N. Calace, L. Campana, M. Di Leginio, F. Floccia, F. Fumanti, L.C. Lorusso, S. Lucci, G.L. Maschio, P. Paris, S. Ursino) p. 218

Applicazione delle guide tecniche per l'attuazione del regolamento reach all'analisi di rischio ambientale: esempio dello scarico di arsenico e suoi composti nelle acque marine (C. Milillo). p. 221

Verifica della conformità di detergenti alla normativa vigente mediante analisi chimico-ecotossicologiche (M. Casera, F. Lazzeri) p. 228

Protocollo sperimentale per il controllo della compatibilità ambientale di materiali innovativi (P. Frisenda, M. Francese) p. 235

Valutazione della ecotossicità dei rifiuti: implementazione dell'approccio di base utilizzando una batteria di saggi di tossicità acuta, cronica e di mutagenicità (T. Leoni, L. Liuti, S. Sarcina, A. Valenti) p. 242

**Tavola rotonda 3: attuazione della direttiva quadro relativa alla strategia marina (D.lgs 190/2010): quadro conoscitivo nazionale e stato dell'arte** p. 247

Il report sulla contaminazione da sostanze pericolose ai sensi della direttiva quadro sulla strategia marina 2008/56/CE (G. Giorgi) p. 248

Il ruolo dell'ecotossicologia nell'ambito degli obiettivi della marine strategy framework directive (C. Maggi, F. Onorati) p. 249

**Poster appartenenti ad "altre tematiche"** p. 250

Valutazione ecotossicologica e applicazione dell'indice macrofitico IBMR nell'area di estrazione petrolifera della regione basilicata (M. Casamassima, G. Filippo, A. Marraudino, S. Longo, T. Trabace, A. Palma) p. 251

Genotossicità indotta da bromuro di rame in *Vicia sativa* L. (L. M. Bellani, L. Giorgetti, S. Muccifora) p. 259

Test tossicologici su *Vicia faba* L. per la validazione di processi di biorisanamento (L. Giorgetti, S. Di Gregorio, R. Lorenzi, C. Corsi, M. Ruffini Castiglione) p. 262

Caratterizzazione (chimico fisica ecotossicologica) ed analisi rischio ecologico di biocidi antivegetativi nel sud del Mar Adriatico Progetto CARISMA (S. Manzo, G. Ansanelli, S. Chiavarini, G. Di Landa, B. Lanza , P. Massanisso C. Monopoli, L. Parrella, A. Salluzzo, S. Schiavo, A. Tabaku , P. Aleski, P. Lazo) p. 267

## PRESENTAZIONE

---

Come concordato dal comitato scientifico assieme a tutti i partecipanti alle 5 Giornate di Studio “Ricerca e Applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici Contaminate” vengono di seguito riportate alcune proposte sintetiche suddivise per le diverse tematiche affrontate (sessioni/tavole rotonde). Un resoconto più dettagliato, a cura dei relativi moderatori, viene riportato all’inizio di ogni sessione/tavola rotonda.

### **Sessione A: criteri innovativi di indagine ecotossicologica**

Alla luce della recente pubblicazione dei protocolli UNICHIM sui crostacei, è emersa l’esigenza di riconsiderare l’organizzazione e le finalità dei singoli GdL nell’ambito della commissione “Qualità dell’acqua” (GdL metodi Biologici) dei diversi gruppi di organismi, ponendo in primo piano l’opportunità di proseguire con gli esercizi di interconfronto di altri biosaggi per completare il percorso di normazione.

Una proposta che possa essere integrativa ai vincoli imposti da UNICHIM è quella di realizzare e pubblicare metodi ISPRA, nell’ambito delle pubblicazioni dei “Manuali di Ecotossicologia”, che possano esplicitare il metodo e aggiungano anche dati più di carattere scientifico.

Più in generale è apparsa evidente l’esigenza di attribuire un ruolo maggiormente istituzionale alla comunità scientifica e tecnica che ha partecipato al convegno, ritenuta rappresentativa di tutto il substrato nazionale attivo nel settore dell’ecotossicologia marina e/o acquatica. Una possibilità in tal senso potrebbe essere quella di creare in ambito ISPRA un gruppo di esperti (rappresentanti selezionati della nostra comunità tecnico-scientifica) a disposizione dell’Amministrazione assolutamente a titolo gratuito per tutte le problematiche riguardanti questa tematica prevedendone una sua partecipazione ai tavoli tecnici dei Ministeri competenti.

### **Tavola rotonda 1: certificazione, accreditamento e prove interlaboratorio**

Dalla discussione è emerso un particolare interesse per l’organizzazione di confronti interlaboratorio per i saggi ecotossicologici, per i quali attualmente non esistono provider accreditati ACCREDIA, ma che vengono ritenuti indispensabili per l’inserimento in qualunque normativa, estendendo il percorso di standardizzazione inserito nella attuale revisione del DD del 24.12.2003, ovvero il DD 24.11.2011, relativo all’impiego in mare di prodotti assorbenti e disperdenti. In tal senso si propone di chiedere un incontro tecnico con ACCREDIA e MATTM per discutere la possibilità di ottenere un percorso diversificato di accreditamento in base allo scopo dei laboratori e agli Enti coinvolti (sviluppo biosaggi, intercalibrazione, applicazione dei biosaggi), sulla base di una bozza di un testo da condividere e predisporre allo scopo.

Sollecitato dai partecipanti, ISPRA si ripropone di verificare la possibilità di organizzare questo tipo di confronti interlaboratorio e di cooptare per tale attività altri soggetti che consentano di estendere la partecipazione anche a laboratori non ARPA. Dovrebbe essere coinvolta anche la struttura ISPRA che si occupa di materiali di riferimento, per la preparazione di tossici di riferimento e campioni cechi. Infine, una prospettiva interessante potrebbe essere quella di organizzare contemporaneamente 3 confronti interlaboratorio (su batteri bioluminescenti, alghe

e crostacei), così da consentire per la prima volta un confronto su una batteria di saggi, seppur minimale.

### **Sessione B: argomenti emergenti in ecotossicologia: dai nanomateriali alla tossicogenomica**

Nell'ambito di questa sessione sono state affrontate le tematiche di punta in ecotossicologia con particolare riferimento ai nanomateriali ingegnerizzati. È stata evidenziata la necessità di approfondire specialmente il trinomio caratterizzazione dei nanomateriali – modalità di esposizione in situ (ambienti marini) – analisi degli effetti biologici. Un altro aspetto emerso con preponderanza è il fatto che molte delle attività di ricerca effettuate sono state condotte con un finanziamento dedicato ridotto o addirittura assente, ma soprattutto con molta disponibilità e spirito di sacrificio da parte dei ricercatori coinvolti.

A questo proposito, al termine della sessione è stato dato l'annuncio della costituzione, in seno alla Società Italiana di NanoTossicologia (SIN), del Gruppo di Lavoro a livello nazionale in "Nano-Ecotossicologia Marina". Il GdL è nato con lo scopo di creare un'aggregazione tra ricercatori appartenenti a varie Università, Enti di Ricerca, Enti Locali ed Imprese, interessati alla tematica, con l'obiettivo di costituire una rete organizzata di collaborazione fattiva, anche di tipo progettuale. Al momento sono state raccolte già circa trenta adesioni, destinate ad aumentare con i prossimi appuntamenti scientifici. (Una prima riunione degli aderenti al GdL è stata effettuata successivamente alle giornate in coincidenza al 1st Marine NanoEcotox Workshop a Palermo il 29 Novembre 2012).

Da questa iniziativa è emerso che risulta essere di estrema importanza la redazione come Gruppo di Lavoro a livello nazionale in "Nano-Ecotossicologia Marina" di un "Position paper" della nostra comunità scientifica allargata per chiedere un incontro con il Ministero e discutere le strategie future che il paese deve sviluppare su questo argomento emergente. Dovremo spendere anche in ambito nazionale gli sforzi che già stiamo facendo in ambito internazionale (es. Nano Safety cluster). Se vogliamo in futuro attenzione anche economica per questa tematica dobbiamo far sapere che ci siamo, siamo organizzati e già proiettati verso l'Europa.

### **Sessione C: applicazioni del Manuale ISPRA (67/2011) sulle batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre**

La sessione ha evidenziato una interessante risposta da parte della comunità scientifica, in termini di accesso al sito web di ISPRA che riporta il Manuale ISPRA 67/2011. Tuttavia, non c'è stata l'attesa interazione con i possibili utenti, per la pressoché assoluta mancanza di commenti e/o suggerimenti migliorativi a tale Manuale. Considerando che tale mancata risposta potrebbe essere dovuta alla obiettiva difficoltà di utilizzare i sistemi di calcolo proposti (per la ponderazione delle batterie e per l'elaborazione dell'indice sintetico), ISPRA si riserva di verificare la possibilità di sviluppare un software, da abbinare in rete al Manuale ISPRA 67/2011, per facilitare tali elaborazioni. Durante la sessione si è anche discusso sulle modalità di finanziamento per la realizzazione del sistema di calcolo (software) che potrebbero essere sostanzialmente due e/o l'insieme delle due:

- 1) una sostenuta direttamente o interamente da un privato
- 2) una sostenuta dagli Enti interessati che cofinanzieranno lo sviluppo e il mantenimento del tool (che sarà un sito in rete sponsorizzato da tutti).

Infine, è stato proposto un analogo manuale, dedicato però alle batterie di saggi ecotossicologici per acque dolci, di cui è già in corso di revisione una prima bozza. Anche tale manuale verrà pubblicato sul sito web di ISPRA entro l'estate 2013.

### **Sessione D: ruolo dell'ecotossicologia nell'ecosostenibilità dei processi produttivi e nella definizione della pericolosità dei materiali (parametro H14).**

In definitiva, ISPRA si è impegnato a redigere le proprie linee guida sugli aspetti tecnico – analitici per il protocollo ADR e allo stesso tempo è emersa l'esigenza da parte dei partecipanti al convegno di introdurre nella norma e negli allegati tecnici protocolli molto più coerenti con le linee guida elaborate dal GdL ISPRA fino ad ora. Si ipotizza di indire una nuova riunione tematica nei prossimi mesi.

### **Tavola rotonda 2: bandi e opportunità nazionali/internazionali in ambito ecotossicologico**

La tavola rotonda ha sottolineato l'importanza di una nuova figura professionale che, anche se stenta ad essere riconosciuta e sostenuta, in questi ultimi anni ha assunto una importanza strategica fondamentale: il manager della ricerca. Nell'ambito della nostra comunità potremmo tentare di valorizzare queste figure interne ad ogni ente e tentare di "fare squadra" mettendole in contatto in una specie di "GdL virtuale" sulla progettualità ed in rete a disposizione di tutti per sfruttare le diverse opportunità regionali, nazionali ed internazionali che i diversi bandi possono offrire per le eterogenee tematiche di nostro interesse.

### **Tavola rotonda 3: attuazione della direttiva quadro relativa alla strategia marina (D.lgs 190/2010): quadro conoscitivo nazionale e stato dell'arte**

In base alla comunicazioni di apertura del Dr. G. Giorgi e della Dr.ssa Maggi è stata messa in evidenza, a fronte di un inquadramento giuridico generale e degli obiettivi con le relative scadenze stabilite dal D.L. 190 che recepisce la Direttiva Quadro sulla Strategia Marina 2008/56/CE (MSFD) la mancanza di un ruolo affidato alle analisi ecotossicologiche mediante saggi biologici. L'attuale conformazione dei Reporting Sheets per mezzo dei quali i dati devono essere inviati alla Commissione Europea non contempla, infatti, l'utilizzo dei saggi biologici per la valutazione degli impatti, in quanto (per definizione) non è possibile associare gli effetti con la pressione (concentrazione di specifici contaminanti in acqua, sedimenti e biota). Al fine di recuperare il ruolo dei saggi biologici è stato concordato, con il supporto del MATTM, di produrre al più presto una nota ufficiale a nome di tutti gli enti rappresentati nel convegno da indirizzare a quest'ultimo, nel quale oltre a far presente la problematica, si chiede di farsi portavoce in sede comunitaria di individuare un percorso giuridico e tecnico per introdurre il contributo informativo fornito dai saggi biologici.

*David Pellegrini e il comitato scientifico*

## SESSIONE A: CRITERI INNOVATIVI DI INDAGINE ECOTOSSICOLOGICA

*di Isabella Buttino e Marco Faimali*

---

In questa sessione sono pervenuti 12 poster e sono state effettuate 6 comunicazioni orali oltre a quella plenaria del Prof. Viarengo.

Le presentazioni (comunicazioni orali e poster spotlight) hanno riguardato l'utilizzo di nuove specie appartenenti a gruppi funzionali non presi in considerazione in precedenza (quali protisti e celenterati), nuovi endpoint e diversi ambiti di applicazioni di saggi biologici, includendo anche quelli già standardizzati. Molta importanza è stata data ad endpoint di tipo genotossico e sub letale. È stata evidenziata la consapevolezza di una grande possibilità di innovazione scientifica a livello nazionale, che tuttavia non trova adeguato recepimento a livello politico-legislativo.

Alla luce della recente pubblicazione dei protocolli UNICHIM sui crostacei, è emersa l'esigenza di riconsiderare l'organizzazione e le finalità dei singoli GdL nell'ambito della commissione "Qualità dell'acqua" (GdL metodi Biologici) dei diversi gruppi di organismi, ponendo in primo piano l'opportunità di proseguire con gli esercizi di interconfronto di altri biosaggi per completare il percorso di normazione.

Una proposta che possa essere integrativa ai vincoli imposti da UNICHIM è quella di realizzare e pubblicare metodi ISPRA, nell'ambito delle pubblicazioni dei "Manuali di Ecotossicologia", che possano esplicitare il metodo e aggiungano anche dati più di carattere scientifico.

Più in generale è apparsa evidente l'esigenza di attribuire un ruolo maggiormente istituzionale alla comunità scientifica e tecnica che ha partecipato al convegno, ritenuta rappresentativa di tutto il substrato nazionale attivo nel settore dell'ecotossicologia marina e/o acquatica. Una possibilità in tal senso potrebbe essere quella di creare in ambito ISPRA un gruppo di esperti (rappresentanti selezionati della nostra comunità tecnico-scientifica) a disposizione dell'Amministrazione assolutamente a titolo gratuito per tutte le problematiche riguardanti questa tematica prevedendone una sua partecipazione ai tavoli tecnici dei Ministeri competenti.

# NUOVI APPROCCI NELLA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SUBLETALI DEGLI INQUINANTI IN ORGANISMI MODELLO CARATTERISTICI DI DIFFERENTI ECOSISTEMI: DALL'USO DEI BIOMARKER ALLA "SYSTEM TOXICOLOGY"

*di A. Viarengo*

Di.S.I.T. Università del Piemonte Orientale 'Amedeo Avogadro', viale T. Michel 11 - 15121 Alessandria.  
viarengo@unipmn.it

---

## ***Introduzione***

L'analisi del rischio ecologico nella valutazione del rischio della biodiversità e della vulnerabilità biologica sta assumendo sempre maggiore importanza negli studi sulla qualità ambientale in particolare nelle aree ad elevata contaminazione siano esse terreni, fiumi e laghi o zone marino costiere.

Come noto l'approccio TRIAD, spesso utilizzato in questi studi, prevede l'utilizzo di dati chimici, ecotossicologici ed ecologici nella valutazione della qualità ambientale ed è importante mettere in evidenza che solo i dati ecotossicologici possono rilevare la tossicità delle matrici indagate. Infatti, i dati chimici non chiariscono il reale livello degli inquinanti biodisponibili nelle matrici né il possibile effetto additivo, sinergico o antagonistico delle sostanze tossiche presenti nelle miscele di inquinanti; inoltre gli importantidati ecologici possono essere notevolmente influenzati dalla presenza antropica anche in assenza di inquinamento delle matrici.

## ***Risultati e discussione***

In questa comunicazione verranno presentati alcuni degli organismi più spesso utilizzati nei programmi di biomonitoraggio, verranno inoltre mostrati gli organismi modello che possono essere impiegati per valutare la qualità delle acque e dei sedimenti o la qualità dei suoli utilizzando quale endpoint negli esperimenti il tasso di sopravvivenza e di riproduzione; inoltre verranno descritti differenti endpointsubletali (biomarker) che, a differenti livelli di organizzazione biologica, possono identificare il livello di stress raggiunto negli organismi esposti alle matrici inquinate.

L'uso di un batteria di biomarker impone una necessaria integrazione dei dati in indici sintetici per poter essere facilmente utilizzati dai manager ambientali e dalle diverse parti interessate (stakeholders) e pertanto verranno presentati alcuni sistemi di integrazione dei risultati delle analisi dei biomarkers.

Infine è importante considerare la ricaduta positiva che gli sviluppi della 'systembiology' ha portato nelle ricerche relative gli effetti delle sostanze tossiche sugli organismi viventi. In particolare verranno presentati risultati riguardanti l'uso di trascrittomica, proteomica e metabolomica in organismi modello non tutti ad oggi con un DNA nucleare sequenziato.

Per chiarire l'uso dell'approccio proposto verranno mostrati i dati relativi ad alcuni studi sia di campo che di laboratorio riguardanti importanti tematiche ambientali quali l'inquinamento da inorganici e da IPA e diossine.



# THE USE OF PROTISTS IN ECOTOXICOLOGY: APPLICATION OF MULTIPLE ENDPOINT TESTS ON THE EPIBENTHIC, FREE CRAWLING CILIATE *E. CRASSUS* FOR THE EVALUATION OF SEDIMENT QUALITY IN MARINE COASTAL ECOSYSTEMS

by A. Gomiero<sup>a,b,\*</sup>, A. Dagnino<sup>b</sup>, A. Negri<sup>b</sup>, S. Sforzini<sup>b</sup>, A. Viarengo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> National Research Council – Institute of Marine Science (ISMAR), Ancona, Italy - alessio.gomiero@an.ismar.cnr.it

<sup>b</sup> Università del Piemonte Orientale, dep. of Science and Technological Innovation (DISIT), Alessandria, Italy - viarengo@unipmn.it

---

**Abstract** - Despite of an increasing number of surveys describing adverse contaminated sediments effects in marine organisms, few previous studies have addressed protists. In this study the free-crawling marine ciliate *Euplotes crassus* was evaluated as first validated as novel biological model and then utilized as a test organism for the screening of sediment toxicity using sediments from both coastal and estuarine sites. Two endpoints of high ecological value, mortality (Mry) and replication rate (RpR), were evaluated in combination with two sublethal biomarkers of stress, endocytotic rate (Ecy) and lysosomal membrane stability (NRRT). The results of validation test showed a significant direct dose/response relationship. In the meantime, results of a pilot biomonitoring program in the Venice Lagoon showed a significant inhibition of RpR, Ecy and NRRT, paralleled by a small and insignificantly increased Mry of exposed specimen. Our results thus demonstrate that only a combination of mortality and sublethal biomarkers was able to characterize an exposure-related stress syndrome. The described suite of biomarkers were able to resolve a pollution-induced stress syndrome also at an early stage. Biological responses were consistent with the contamination levels in sediments suggesting a high potential for using Protozoa in bioassays to assess environmental risk in marine coastal systems.

Keywords: protozoa, bioassay, biomarkers, sediments, endocytosis rate

## *Introduction*

In recent decades, the levels of contaminants in the marine environment have increased as a consequence of anthropogenic activities, leading to serious ecological and human health problems. In aquatic systems, partition and bioavailability of these chemicals strongly depend on biological processes, redox potential, ionic strength, pH, activities of organic and inorganic chelators and scavenging processes (Arjonilla et al., 1994). As a consequence of all these naturally occurring processes, sediments have become the sink of thousands of xenobiotics and heavy metals in estuarine and marine environments. The contamination of sediments by inorganic and organic micro-pollutants is an unsolved problem in numerous coastal ecosystems, estuaries, lakes and rivers and might cause potential irreversible adverse effects to ecosystems as more and more people live close to marine and coastal environments that frequently include habitats of great ecological value. A combined chemical-biological approach can provide valuable information on the bioavailability of pollutants, as well

as on complex toxic effects of chemical mixtures. Thus, the incorporation of multiple and ecologically relevant endpoints in the ecotoxicological test used into routine environmental management programs seems to represent a pragmatic mean of linking environmental fate with its causes. Ciliated protozoa represent an important component of the aquatic environment and have an important function in bridging the flow of oligo- and macro-elements to higher trophic levels (Rehman et al., 2008). Studies on the interactions between ciliates and environmental pollutants are scarce compared with other microorganisms despite the fact that ciliates are easy to culture and considered to be reliable biological models and hence good candidates for use in bioassays (Gutierrez et al., 2003). As single cells, directly exposed to the external environment, protozoa may be more sensitive to environmental alterations than the cells of higher organisms that are part of differentiated and complex biological structures. Studies performed on ciliates led to considering their behavior as one of the most interesting expressions of the adaptive response to environmental stress, capable of revealing alterations at higher, like population or community levels. Hence, the potential of protists as a predictive tool for hazard and risk assessment in the water and sediments quality criteria of estuarine and coastal environments has been evaluated by performing toxicity tests under strictly controlled laboratory conditions and then validating them as novel bioassay by a pilot biomonitoring study in the Venice Lagoon. In our study we employed the marine ciliate protozoa *Euplotes crassus* (Dujardin, 1841). Within the first phase of our research activity, we developed a battery of tests which included cell viability and replication rate as typical ecotoxicological acute and chronic tests. Our approach also focused on identifying sensitive sublethal early-warning responses utilizing biological parameters such as lysosomal membrane stability and endocytotic rate, which are typical stress biomarkers in eukaryotic cells. The sensitivity of *E. crassus* bioassay has been evaluated by exposing the organisms to widely occurring inorganic pollutants, such as essential ( $\text{Cu}^{2+}$ ) and non-essential ( $\text{Hg}^{2+}$ ) heavy metals, as well as to the organic pollutant toxicant model benzo[a]pyrene (BaP) and mixtures of them. In the field validating activities following phase we evaluated the impact of contaminated sediments collected from four different sites in the Venice Lagoon (Fig. 1) which represents a coastal area with a peculiar ecosystem characterized by an high ecological and economic value. A growing public concern about biological and ecological conservation of this area has also directed research funding towards environmental monitoring programs.

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

***Cell culture*** - *E. crassus* were isolated from samples collected in The Tyrrhenian sea (Italy). Ciliated protozoa were grown in ASTM standardized artificial seawater (34 ‰, pH= 8.0) and kept at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  under oxygen saturation. Organisms were fed with *D. salina*, kept in dark conditions and analyzed during their logarithmic growth phase.

***Chemicals and treatments*** - Chemicals of analytical grade (purity  $\geq 99\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich if not otherwise stated. B[a]P was dissolved in anhydrous dimethylsulfoxide (DMSO) to prepare a stock solution. In order to exclude any effect of the solvent, the same amount (1% v/v) was added to reference cells in experiments involving B[a]P. Stock solutions of  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and BaP were prepared by dissolving pure compounds in artificial seawater, while working solutions were prepared by diluting stock solutions to the following final concentrations: 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$  [ $\text{Cu}^{2+}$ ]; 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 nM

[Hg<sup>2+</sup>]; and 50, 100, 200, 300, 400, 500 nM [BaP]. Treatments and toxicity tests were performed as described in Gomiero *et al.*, (2012a).

*Toxicity test* - Cell viability, replication rate, endocytotic rate and lysosomal membrane stability test were assessed as described in our previous work (Gomiero *et al.*, 2012a).

*Statistics* - A first statistical analysis of the data from all treatments was carried out using a two-way ANOVA. Biological responses obtained from every toxicant's concentration were compared with control organisms. Results were further analyzed by the Student-Newman-Keuls multicomparison test to statistically discriminate the sensitivity to tested toxicants. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ . Analyses were performed using Statistica 9.0 package (Statsoft, USA). LC<sub>50</sub> was estimated by using the Trimmed Spearman-Kärber method while NOEC, LOEC, EC<sub>25</sub> and EC<sub>50</sub> were calculated by the MixTox model (Jonker *et al.*, 2005).

*Sampling sites* - Sediments were sampled from four different sites in the Venice Lagoon during spring 2009 (Fig 1). Sampling sites were Marghera harbor (MH), Millecampi valley (MV), Murano island (MI) and Lido inlet (LI) which was considered as reference. The sites were selected to address differences in contamination levels as well as in the composition of pollutants (Gomiero *et al.*, 2012b).



Fig 1- Map of sampling sites modified from Gomiero *et al.*, 2012b

*Sediment collection and elutriate preparation* - Surface sediments (0–5 cm) were sampled using a 10 cm diameter Plexiglass corer, transported to the laboratory and sub-sampled prior to chemical characterization. One aliquot was kept at 4 °C in the dark until being used in toxicity tests. One aliquot sample to be used for chemical analysis was stored at -40 °C. Elutriates were obtained by vigorous shaking of sediments for 1h with artificial seawater in a 1:4 ratio to release adsorbed pollutants (US EPA, 1991).

*Chemical analysis and SEM-AVS determination*- As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Cu and Zn were extracted from 10 gr (w.w.) sediment according to US EPA 3050B method while the level of each metal was assessed by the US EPA 6010C method. Polycyclic aromatic hydrocarbons were extracted and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) according to the method described by Baumard *et al.* (1999). The procedures for AVS and SEM analyses were adopted from the method described by Allen *et al.* (1993). Data were integrated according to the following formula:  $(SEM_{[i]} AVS) / OC_i$ , where:  $SEM_{[i]}$  = Simultaneously Extracted Metal of [i] element - ( $\mu\text{mol/g dw}$ ); AVS = Acid Volatile Sulfide ( $\mu\text{mol/g dw}$ );  $OC_i$  = Fraction of organic carbon ( $\text{g}_{\text{OC}} \text{dw}$ ). The assessment of the degree of pollution was extrapolated according to the US EPA 600-R-02-011:2005 method.

## Results

### Laboratory test

The results of the acute tests (Fig. 2A) demonstrated that Cu-related exposures caused 90% mortality at nominal concentrations of 100 mM, whereas a clear decrement was observed for concentrations ranging from 50 to 1 mM. No effect on cell viability was found after the exposure 500  $\mu\text{M}$ . An exposure to  $\text{Hg}^{2+}$  at 250  $\mu\text{M}$  was lethal for all the cells, while concentrations ranging from 100 to 5  $\mu\text{M}$  induced progressively lower mortality rates. The organic pollutant B(a)P heavily affected protozoa viability for treatments at 100  $\mu\text{M}$ , however toxic effects decreased significantly in exposures from 50 to 5  $\mu\text{M}$ . Furthermore, the 1% DMSO (v/v) related exposures showed no significant effects on mortality, leading to the conclusion that no toxicity was induced by the organic carrier used during the exposure tests. On the other hand, exposures from 10 to 750  $\mu\text{M}$  Cu caused a significant decrease in the mean fission rate after 24h treatment. In contrast, exposure to 5  $\mu\text{M}$  did not affect protozoa replication rates. On the other hand, mercury toxicity increased substantially starting from 10 nM and up to 1  $\mu\text{M}$ , while no effects were observed for 5 nM of Hg.

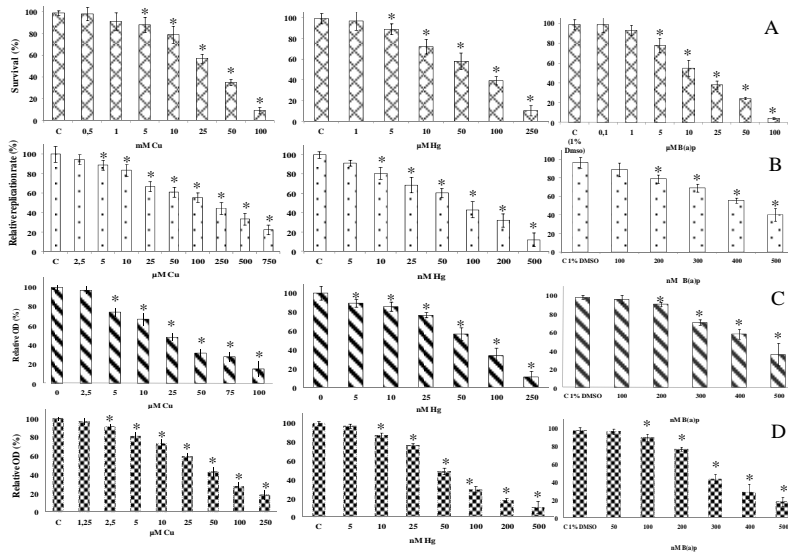


Fig. 2 – *E. crassus* biological responses to chemicals treatments. \*  $p < 0,05$

The exposure to B(a)P at the concentration of 100 nM did not induce a significant reduction in fission rate, whereas concentrations starting from 200 up to 500 nM caused a progressive and significant decrement of replication capability. No significant effect was observed in ciliates exposed to 1% (v/v) DMSO treatment, that being the organic phase adopted within the exposure experiments to solve BaP in the aqueous solution. NR exhibited a concentration-dependent reduction for all three exposure chemicals. The lowest significantly effective nominal concentrations were observed in organisms exposed to 5 μM Cu, 2. Exposure to 5 nM Hg did not significantly affect protozoa endocytosis rate, but in the meantime significant reductions were observed when exposing single-cell organisms from 50 nM up to 100 nM.

*Field validation results*

Mortality rates in groups exposed to contaminated sediments were higher than in the field control group, although only significantly higher in the group exposed to sediments from site MH (Fig. 3A).

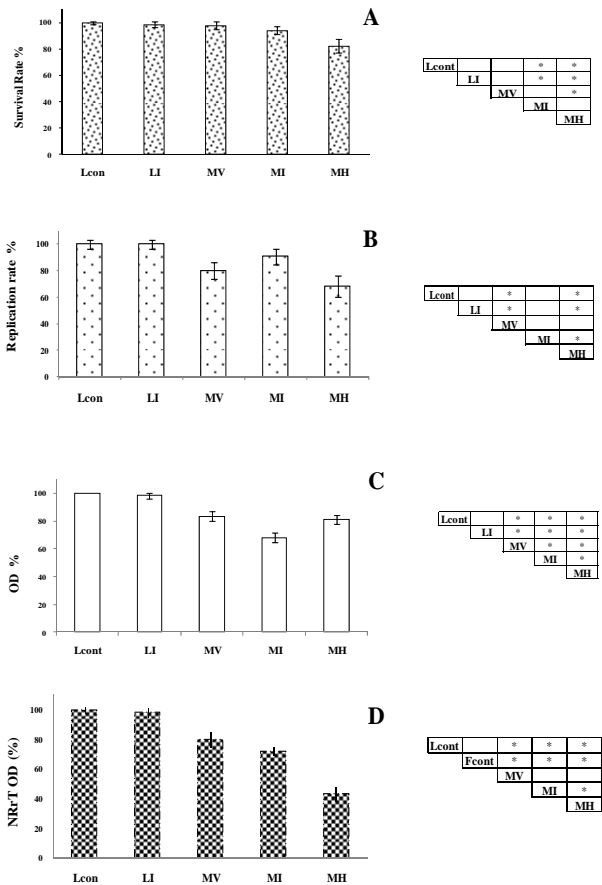


Fig.3 – Biomonitoring program. Biological responses in *E. crassus*. \*  $p < 0,05$ .

The results showed a significantly reduced replication rate in ciliates exposed to sediments from MH and MV [ANOVA,  $p < 0,05$ ]; whereas protozoa exposed to

sediments from MI were not affected. Also, all groups exposed to contaminated sediments from MH, MV and MI showed a significant reduction of Ecy with respect to the field control site (Fig. 3B, ANOVA,  $p < 0.05$ ). The most remarkable effect on Ecy was observed in protozoa exposed to sediment from the Porto Marghera industrial site. Lower inhibition of Ecy was observed for MI and MV (Fig. 3C). The results of the NRRT test provided further support for a sub-lethal stress syndrome in tested ciliates. Similar to the results from the Ecy test, sediments from site MH had the highest impact on ciliates but also samples collected at MI and MV rendered a significantly reduced lysosomal integrity (Fig. 3D, ANOVA  $p < 0.05$ ). As regards the levels of metals in sediments (tab. 1), the highest arsenic levels were recorded in samples collected from sites MH and MI, both representing significantly higher levels than the field control (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Tab. 1 – Results of metals analysis on sediments (mg/kg d.w).

	LI	MV	MI	MH
As	8,9 ± 0,9	11,0 ± 0,5 *	16,3 ± 0,2 *, a	15,3 ± 0,7 *, a
Cd	0,37 ± 0,11	0,27 ± 0,02	1,62 ± 0,33 *	5,11 ± 0,52 *
Cr	13,7 ± 1,0	22,8 ± 1,5 *	31,5 ± 1,5 *, a	29,9 ± 1,0 *, a
Hg	0,15 ± 0,05	0,19 ± 0,05	1,54 ± 0,13 *	1,37 ± 0,10 *
Ni	13,81 ± 0,5	17,8 ± 0,9 *	23,43 ± 0,40 *, a	22,73 ± 1,25 *, a
Pb	11,3 ± 1,1	26,2 ± 1,7 *	53,0 ± 2,1 **	35,0 ± 1,0 *
Cu	10,1 ± 0,6	13,6 ± 0,5 *	48,4 ± 0,5 *, a	47,1 ± 0,6 *, a
Zn	24,8 ± 5,4	45,1 ± 4,9 *	307,4 ± 24,7 **	234,1 ± 13,1 **

Cd levels showed a similar trend with sediments from sites MH and MI containing significantly higher levels with respect to both MV and LI (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Cr concentrations were significantly higher in sediments from all exposed sites with respect to the field control, and also a concentration gradient with significant differences amongst the different sites ( $p < 0.05$ ).  $MH > MI > MV > LI$ . Similar to the results obtained for Cr, Ni results suggest a concentration gradient of this pollutant in the monitored area thus suggesting the same source of nickel pollution.

Tab. 2. Results of SEM-AVS analysis on sampled sediments.

	SEM-AVS/foc (µmol/g oc)							
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
LI	nc	-29	-29	-29	n.c.	-29	-29	-19
MV	-34	-35	-35	-32	n.c.	-34	-33	-21
MI	-64	-66	-55	<b>732</b>	n.c.	-65	<b>987</b>	-29
MH	-112	-113	<b>727</b>	-94	n.c.	-110	-107	-36

On the other hand, samples collected from site MH expressed a value of 727 µmol/gOC for Cr (tab.2), while sediments sampled at site MI had SEM-AVS values of 732 and 978 µmol/gOC for Cu and Pb, respectively. As regards the levels of organic pollution, a PAHs concentration gradient was observed with the following pattern:  $MH > MI > MV > LI$  (tab. 3). Regarding the 16 prioritized PAHs, the major contributions came from pyrene at sites MH, MI and MV and fluoranthene at sites MH and MI (Gomiero et al., 2012b).

Tab. 3 – PAH distribution in sampled sediments ( $\mu\text{g}/\text{kg d.w.}$ )\*  $p < 0.05$

	LI	MV	MI	MH
Na	1,6 ± 0,1	4,18 ± 0,12 *	10,5 ± 1,10 *	105,9 ± 5,0 *
Acnt	0,33 ± 0,05	0,35 ± 0,05	1,3 ± 0,25 *	127 ± 13,5 *
Anct	2,3 ± 0,20	0,81 ± 0,01 *	2,2 ± 0,15	32,8 ± 2,6 *
Flu	0,83 ± 0,05	0,9 ± 0,2	3,6 ± 0,79 *	47,3 ± 1,6 *
Phen	2,9 ± 0,15	10,4 ± 0,4 *	15,6 ± 1,5 *	107 ± 7 *
Ant	0,36 ± 0,15	1,6 ± 0,15	3,6 ± 0,40	43,6 ± 4,6 *
Fluo		20,8 ± 1,4	33,3 ± 6,0	226,9 ± 25,8 *
Py	1,6 ± 0,15	24,2 ± 1,0 *	34,4 ± 2,0	458,2 ± 9,5 *
B(a)an	2,6 ± 0,19	2,1 ± 0,25	15,1 ± 3,0 *	147,5 ± 5,1 *
Chry	1,1 ± 0,1	4,3 ± 0,32 *	21,9 ± 4,0 *	170 ± 11,7 *
B(b)fl	2,2 ± 0,09	2,4 ± 2,0	31,3 ± 1,5 *	215,6 ± 16,1 *
B(k)fl	1,96 ± 0,15	12,3 ± 1,5 *	13,7 ± 3,0 *	71,1 ± 12,8 *
B(a)p		5,6 ± 1,5 , a	5,8 ± 4,7 *, a	157 ± 11,3 *
Ind(1,2,3)p	1,03 ± 0,05	11,16 ± 2,5 *	1,7 ± 3,3	71,7 ± 4,0 *
Dib(a,h)ant		2,7 ± 0,49 *	6,3 ± 0,5 *	19,8 ± 2,5 *
B(g,h,i)py	2,3 ± 0,25	3,7 ± 2,1 *	15,5 ± 3,0 *	126,6 ± 6,0 *
$\Sigma$ IPA	22,2 ± 4,2	149.1 ± 7,7	246.6 ± 16,7	2098,3 ± 60,4

### Discussion

The use of the ciliated protozoa *Euplotes* sp as experimental models in genetic studies is widely recognized [Zhou et al., 2011]. However, a few papers have focused on its suitability for the further understanding of pollutant-related effects on the physiology of eukaryotic cells [Trielli et al., 2007]. However, in spite of the important role played by ciliated protozoa in the ecology of marine and freshwater ecosystems, little is known about the effects of toxicants upon these microorganisms. Few studies describe the effect of metals on the mortality and on the reduction in food uptake, on the inhibition of growth, and on the reduction in the rate of endocytosis of some freshwater ciliates [Nilsson, 1981]. The aim of this work was to determine the sensitivity of marine ciliate *E. crassus* to some environmentally relevant inorganic and organic pollutants such as copper, mercury and the organic chemical BaP. The results show that the hypotrich ciliate *E. crassus* is sensitive to exposure to metals as well as to the organic chemical, significantly affecting replication rate, lysosomal membrane stability and endocytosis rate of this ciliate. Metals have long been considered to be very harmful to zoobenthos, even at low concentrations. The outcomes of the present work demonstrated that such pollutants can severely alter physiological and ecological processes of the protozoa such as reduction in food uptake and inhibition of growth, hence influencing survival and replication rate. Several mechanisms have been proposed to explain metal-induced cellular toxicity. One of the most accepted is the tendency of free metals ions to participate, by Fenton reaction, in the ROS formation. With regard to cellular targets for metals toxicity, lysosomes might be the main sources of ROS generation [Metha et al., 2006]. This result agrees with those reported in the literature indicating that the effects of metal- or organic compound-exposure on either the lysosomal membrane destabilization and the inhibition of endocytosis rate may have adverse effects on growth and reproduction [Dondero et al., 2006; Nilsson, 1981]. The viability assay revealed that cells survived exposure to low micromolar Hg concentrations, underlining that this species is unable to adapt to rather moderate mercury loads. In the meantime, results of sublethal stress markers pointed out a strong concentration-dependent

effect on LMS, hence confirming the potential of organic pollutants to severely disrupt lysosomal functioning but also its reliability as a general biomarker of stress induced by xenobiotic compounds (Viarengo et al., 2007). Interestingly, among the observed, sub-cellular stress syndrome has been reflected at a higher, behavioral, level as was underlined by a significant inhibition of endocytosis rate.

Our second research line aimed to verify if the ciliated marine protozoa is suitable for investigating the biological effects of contaminants present in complex mixtures in the environment as well as in the procedures for environmental risk assessment in marine coastal systems. Pollutants levels, both organic and inorganic, observed in the present study are in a range of those expected to significantly affect survival as well as induce sub lethal alterations in freshwater and marine protozoa (Gomiero et al., 2012a). Indeed, the results of biological responses on targeted organisms showed that the conditions at the innermost sampling site of Marghera harbor, which corresponds to the industrial, heavily polluted area of Venice Lagoon, was particularly stressful for protozoa as significant increments of mortality rates were scored. Minor effects on protozoa survivorship were recorded in samples collected Millecampi Valley site and apparently no effects were reported for organisms exposed to elutriate samples from Murano island and Lido inlet sites. Nevertheless, the ecological relevance of cellular and sub-cellular biological responses is arguably greater when they are associated with adverse effects at higher levels of biological organization like organism level. Significant inhibitions of replication and endocytosis rates, as well as substantial increments of lysosomal membrane permeability, were observed along the investigated sites. Interestingly, the designed battery of tests was able to follow a significant sub lethal stress syndrome in target organisms where an approach limited on mortality evaluation would have not report the occurrence of harmful environmental effects on marine organisms. In such context, a monitoring program would have not benefit of further environmental risk assessment investigations thus failing to correctly estimate the biological vulnerability hence the quality status of the targeted area. On the other hand, results of chemical analysis confirmed significant levels of almost all investigated trace elements and PAHs. Good correlations were achieved among the observed biological responses and both chemicals levels and inorganic pollutants bioavailability in the investigated sites. On the whole, major stress occurred in the industrial site of Porto Marghera where the presence of significant levels of both organic and inorganic pollutants induced remarkable biological alterations in exposed cells. On the other hand, a comparison among trace elements accumulation in sediments and the results of SEM/AVS determination allowed excluding a significant toxicity related to most of the occurring heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) in sampled sediments. SEM-AVS/foc values  $\leq$  of 130  $\mu\text{mol}/\text{goc}$  identify a scarce trace elements release into interstitial water hence suggesting a negligible metal driven toxicity (US-EPA, 2005). This pointing out that even if data analysis show a clear net of relationship among pollutants levels in sediments and biological responses, the results of statistical analysis require a careful evaluation while assessing the actual sediment's toxicity on targeted organisms (Gomiero et al., 2012b).

### ***Conclusions***

The laboratory toxicity studies demonstrated that the presented marine ciliated protozoa is sensitive to different environmentally relevant organic and inorganic compounds, with different modes of action. The use of two easy to perform cellular biomarkers is suitable for making the protozoa acute bioassay more sensitive to toxic compounds. In fact lysosomal membrane stability and endocytotic rate showed more sensitive concentration-dependent responses in protozoa exposed to low



concentrations of different toxic compounds as compared to typical ecotoxicological endpoints like cell viability and reproduction. These cellular parameters have been proved to be useful in revealing alterations caused by organic and inorganic pollutants, in the physiological status of organisms, hence providing sensitive early-warning responses. This work also aimed to point out the *E. crassus* assay capability to assess sediments ecotoxicity. The developed multiple endpoint approach based on the application of two high level (mortality and replication rate) and two low level tests (endocytosis rate and lysosomal membrane stability) in conjunction with sediments chemical analysis successfully discriminated a gradient of stress within the pilot biomonitoring program (Gomiero et al., 2012b). Relevant ecological information can be inferred by combining the results of mortality, replication, endocytosis rate and lysosomal membrane stability on protozoa. Results support the potential use of *E. crassus* in environmental risk assessment procedures. In fact, the use of protozoa in ERA frameworks is still lacking, even if in a ERA perspective, the application of a battery of different model organisms representative of key functional groups in marine coastal ecosystems is focal to obtain a reliable estimation of potential pollution impacts on the biota.

### ***Acknowledgements***

This work was partially funded under the European collaborative project MEECE, Marine Ecosystem Evolution in a Changing Environment. The authors are grateful to staff members of DiSIT (University of Piemonte Orientale) and Thetis S.p.A for valuable technical assistance

### ***References***

- Allen H.E., G. Fu, B. Deng (1993) Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1441–53.
- Aronilla M., J.M. Forja, A. Gómez-Parra (1994). Sediment analysis does not provide a good measure of heavy metal bioavailability to *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) in confined coastal ecosystems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 810-817.
- Baumard P., H. Budzinski, P. Garrigues, J.F Narbonne, T. Burgeot, X. Michel, J. Bellocq (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research*, 47,5: 415–439.
- Dondero F., H. Jonsson, M. Rebelo, G. Pesce, E. Berti, G. Pons, A. Viarengo (2006) Cellular responses to environmental contaminants in amoebic cells of the slime mould *D. discoideum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143C: 150-157.
- Gomiero A., S. Sforzini, A. Dagnino, C. Nasci, A. Viarengo (2012) The use of multiple endpoints to assess cellular responses to environmental contaminants in the interstitial marine ciliate *Euplotes crassus*. *Aquatic Toxicology*, 114–115: 206– 216.
- Gomiero A., A. Dagnino, C. Nasci, A. Viarengo. The use of protozoa in ecotoxicology: application of multiple endpoint tests of the ciliate *E. crassus* for the evaluation of sediment quality in coastal marine ecosystems. *Science of Total Environment* DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.023
- Gutierrez J.C., A. Martin-Gonzalez, S. Diaz, R. Ortega (2003) Ciliates as potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *European Journal of Protistology*, 39: 461–467.
- Jonker M., C. Svendsen, J.J.M. Bedaux, M. Bongers, J.E. Kammanega (2005) Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio

dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24,10: 2701–2713.

Nilsson J.R. (1981) Effect of copper on phagocytosis in *Tetrahymena*. *Protoplasma*, 109: 359-370.

Metha R., D.M. Templeton, P.J. O'Brien (2006). Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity II. Copper toxicity. *Chemistry-Biology Interactions*, 163: 77–85.

Rehman A., F.R. Shakoori, A.R. Shakoori (2008) Heavy metal resistant freshwater ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. *Bioresource and Technology*, 99,9: 3890-3895.

Trielli F., A. Amaroli, F. Sifredi, B. Marchi, C. Falugi, M.U. Delmonte Corrado (2007) Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of *Euplotes crassus*, a single cell eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments. *Aquatic Toxicology*, 83: 272–283.

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

US EPA 2005. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Metal Mixtures (Cadmium, Copper, Lead, Nickel, Silver and Zinc). EPA-600-R-02-011. Office of Research and Development. Washington, DC

Viarengo A., D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri, A. Koehler (2007) The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146,3: 281-300.

Zhou L, J. Li, X. Lin, A. Khaled, S Al-Rasheid (2011) Use of RAPD to detect DNA damage induced by nitrofurazone in marine ciliate, *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). *Aquatic Toxicology*, 103: 225–232.

# NUOVE METODOLOGIE PER IL MONITORAGGIO ECO-GENOTOSSICOLOGICO IN AMBIENTI DI ACQUE DOLCI: COMET ASSAY SU *DAPHNIA MAGNA*.

di A. Buschini, V. Pellegrini, G. Gorbi

Dipartimento di Bioscienze, Università di Parma, V.le G.P. Usberti 11/A, 43100 Parma.

annamaria.buschini@unipr.it, valerio.pellegrini@studenti.unipr.it, gessica.gorbi@unipr.it

---

**Abstract** - E' stato messo a punto un protocollo standard per la valutazione della genotossicità di sostanze chimiche e campioni ambientali su *Daphnia magna* mediante Comet Assay. Il saggio di genotossicità ha rilevato un danno significativo anche in organismi esposti a campioni ambientali che non sono risultati positivi al test di tossicità acuta. Questi primi risultati dimostrano che l'informazione fornita dal Comet Assay rappresenta una importante integrazione del dato tossicologico.

Parole chiave: *Daphnia magna*, Comet Assay, genotossicità, tossicità, ambienti acquatici

## **Introduzione**

I biomarcatori forniscono informazioni indispensabili sull'esposizione a sostanze i cui effetti negativi possono essere non rilevabili mediante i test tossicologici che considerino solo endpoint di alto livello (mortalità, accrescimento, riproduzione). Rientrano in questa categoria sostanze quali gli interferenti endocrini e sostanze che hanno effetto genotossico (Pickering and Sumpter, 2003; Ohe et al., 2004). L'immissione sempre più massiccia di questo tipo di inquinanti nell'ambiente ha portato le organizzazioni scientifiche internazionali a rivolgere particolare attenzione al rilevamento della loro diffusione e a richiedere nuovi metodi, più efficaci e sensibili, per la valutazione del rischio mutageno/cancerogeno. I test di mutagenesi sono ampiamente utilizzati nella valutazione dell'effetto genotossico sia di singole specie chimiche che di miscele complesse, per le quali l'identificazione delle singole componenti può risultare inattuabile (Ohe et al., 2004). La tecnica dell'Elettroforesi su Gel a Singola Cellula (SCGE) o Comet Assay è divenuto recentemente uno dei metodi più applicati nella valutazione degli effetti mutageni dei contaminanti ambientali grazie alla sua potenziale applicabilità ,in vivo e in vitro, a cellule umane, pesci, molluschi e cellule di piante superiori (Buschini et al., 2003; Buschini et al., 2004; Bolognesi et al., 2004; Pellacani et al., 2006). L'estrema sensibilità di tale test lo ha reso un rapido ed efficace strumento per la valutazione della genotossicità di matrici ambientali (Frenzilli et al., 2009; Dhawan et al., 2009). In questo ambito risulta particolarmente interessante la messa a punto e la disponibilità di saggi di mutagenesi standardizzati che utilizzino organismi pluricellulari in vivo, capaci di rilevare la presenza di un carico genotossico nelle acque. Fra le specie maggiormente utilizzate nella tossicologia degli ambienti acquatici, *Daphnia magna* è sicuramente una delle più diffuse e indicate dalle normative nazionali e internazionali in materia di controllo della qualità e delle immissioni.

I pochissimi lavori presenti in letteratura (Park and Choi, 2007; Lee et al., 2009) sull'applicazione del Comet Test in *D. magna* evidenziano la necessità di una più accurata standardizzazione del metodo.

Obiettivo del presente lavoro è stata la messa a punto di un protocollo estremamente standardizzato per la realizzazione del Comet Assay su *D. magna* che consenta di avviare una procedura di validazione del saggio.

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

E' stato applicato il metodo indicato dai "Manuali e linee guida 29/2003- Metodi ecotossicologici" di APAT e IRSA-CNR, sia per l'allevamento di *Daphnia magna* che per la conduzione dei test di tossicità acuta.

Il Comet Assay è stato applicato secondo la tecnica descritta da Singh et al. (1991). Dopo stratificazione delle cellule in agarosio [LMA], i vetrini sono posti in una soluzione di lisi al fine di digerire sia la membrana plasmatica sia la membrana nucleare. Al termine della lisi, i vetrini sono immersi in tampone alcalino per un tempo opportuno al fine di favorire un corretto unwinding e successivamente sottoposti a corsa elettroforetica. Dopo la corsa, i vetrini sono neutralizzati, fissati in etanolo e mantenuti in termostato a 28°C per 24 h. Prima della lettura al microscopio, il DNA viene opportunamente colorato e le immagini sul vetrino sono analizzate mediante microscopio a fluorescenza collegato con una telecamera monocromatica (sono valutate almeno 50 cellule per vetrino). La misurazione delle diverse comete è effettuata mediante sistema di analisi dell'immagine computerizzata. I vetrini sono analizzati in doppio cieco.

Un aspetto cruciale ed essenziale è stato ottenere, a partire dagli organismi esposti, una sospensione contenente un'unica tipologia di cellule sulle quali effettuare il Comet Assay, in modo tale da avere una risposta cellulare omogenea relativa al danno genotossico. Il primo passo, quindi, è stato valutare diversi metodi di estrazione del tessuto circolatorio di *D. magna*. Questi metodi sono stati applicati a organismi di età diversa usando diversi tamponi di estrazione e mantenimento, utilizzando l'estratto tal quale o filtrandolo attraverso un retino di maglia 50 µm, con lo scopo di individuare per ognuna di queste variabili la combinazione più efficiente e vantaggiosa, in termini di tempo e manualità, per l'estrazione delle cellule di emolinfa. Sono poi stati ricercati i tempi di lisi, unwinding ed elettroforesi più idonei, con l'obiettivo di ottenere la minima migrazione possibile del DNA nei controlli e allo stesso tempo la massima sensibilità nei trattati (Figura 1). La ripetibilità della risposta degli organismi controllo è stata valutata considerando alcuni fattori che possono incidere sulla sensibilità dei neonati, quali l'età della madre e le dimensioni della covata di provenienza. Il protocollo definitivo è stato successivamente calibrato saggiando sostanze ad azione mutagena nota utilizzando concentrazioni generalmente uguali o inferiori ai limiti previsti dalla normativa vigente, se disponibili, per gli scarichi in acque superficiali. Sono stati saggiati, anche in funzione della scelta di una sostanza di riferimento, alcuni metalli [Cr(VI), Cd, Ni], erbicidi [acido 2,4-difenossiacetico (2,4-D), paraquat], perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ed etanolo (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) valutandone anche l'incidenza sulla sopravvivenza degli organismi. Il protocollo è stato quindi applicato a campioni prelevati da alcuni corsi d'acqua della provincia di Parma, in parallelo al test di tossicità acuta previsto dalla normativa vigente, per stimarne la capacità di risposta.

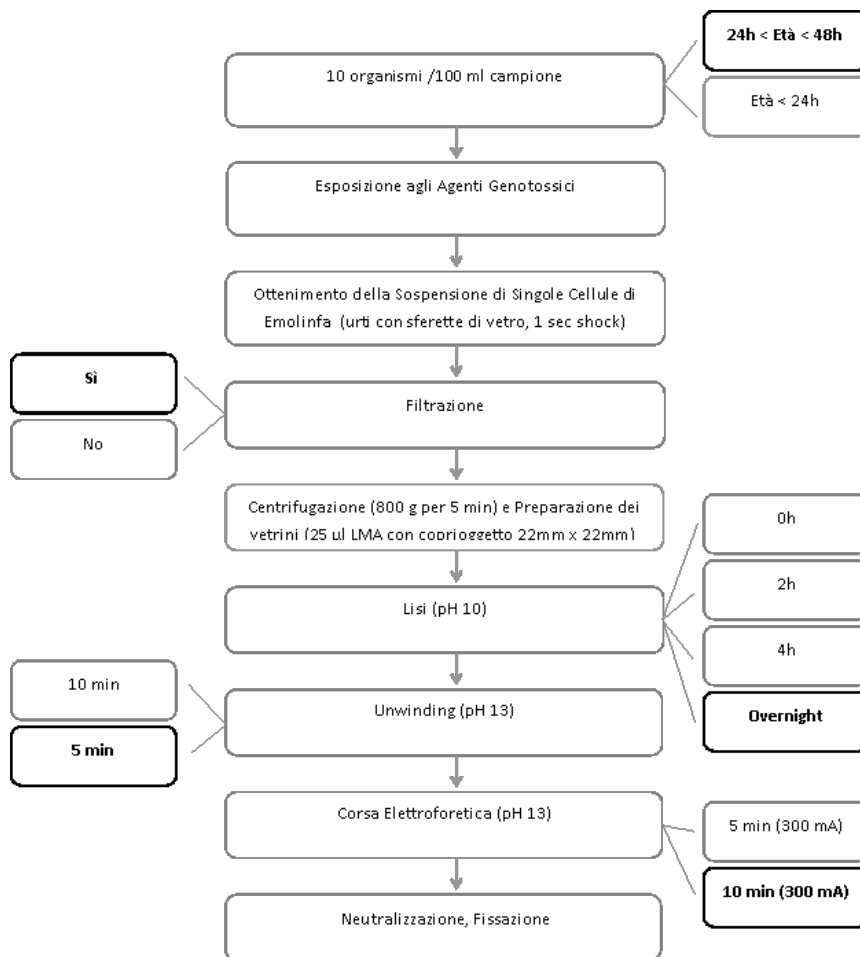


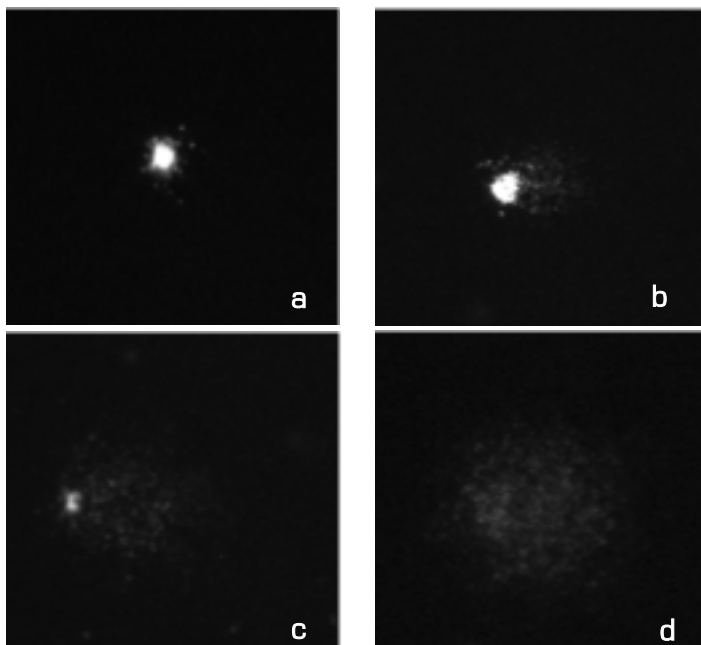
Figura 1. Protocollo Comet Assay adattato a *D. magna*. Vengono riportate nei riquadri laterali le condizioni sperimentate nella messa a punto della metodica; in grassetto sono evidenziate le condizioni scelte per il protocollo definitivo.

## Risultati e Discussione

Il lavoro sperimentale svolto ha permesso di definire e standardizzare un protocollo (Figura 1) per la valutazione della genotossicità di sostanze chimiche e campioni ambientali su *Daphnia magna* mediante Comet Assay.

In base ai risultati di test preliminari sono state definite quattro classi di danno che differiscono tra loro per la migrazione più o meno pronunciata del DNA (Figura 2).

In particolare il protocollo messo a punto consente di ottenere l'isolamento di cellule singole, di dimensione omogenea e presumibilmente appartenenti al tessuto circolatorio, da organismi esposti a xenobiotici in soluzione acquosa. Il protocollo definitivo ha permesso di rilevare meccanismi diversi di danno al DNA, quali danno diretto, danno ossidativo e cross-linking. A titolo esemplificativo, in Figura 3 sono mostrati i risultati del saggio di tossicità acuta e genotossicità con etanolo: il danno genotossico risulta significativo ( $p < 0,05$ ) anche a concentrazioni che non causano immobilizzazione degli organismi.



*Figura 2. Classi di danno definite per il Comet Assay adattato a D. magna. Il danno è crescente dalla immagine a (danno nullo) alla d.*

Il Comet Assay ha rilevato un danno significativo anche in organismi esposti a campioni ambientali che non sono risultati positivi al test di tossicità acuta. Questi primi risultati dimostrano che l'informazione fornita dal Comet Assay rappresenta una importante integrazione del dato di tossicità.

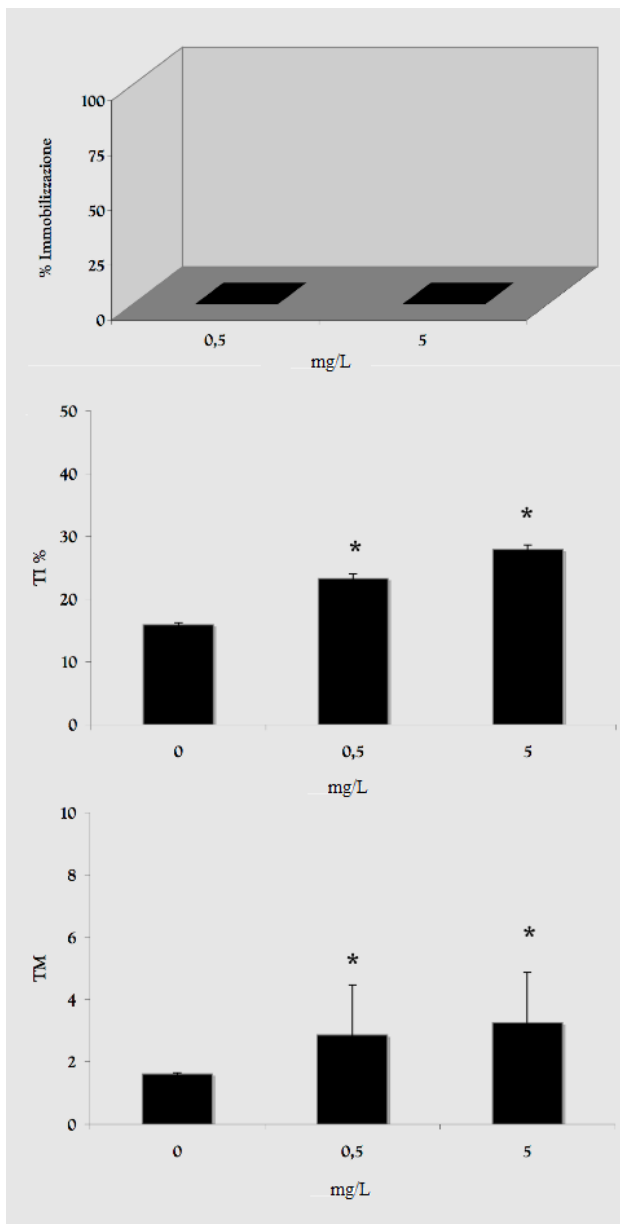


Figura 3. Risultati del test di tossicità acuta (24 h) e di genotossicità (Comet Assay adattato a *D. magna*) per l'Etanolo (media delle mediane  $\pm$  errore standard). TI = Tail Intensity. TM = Tail Moment. \* differenza significativa rispetto al controllo ( $p < 0.05$ ).

### Bibliografia

Bolognesi C., A. Buschini, E. Branchi, P. Carboni, M. Furlini, A. Martino, M. Monteverde, P. Poli, C. Rossi (2004) Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment*, vol. 333: 127-136.

Buschini A., P. Carboni, A. Martino, P. Poli, C. Rossi (2003) Effects of temperature on baseline and genotoxicant- induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research*, vol. 537: 81-92.

Buschini A., A. Martino, B. Gustavino, M. Monfrinotti, P. Poli, C. Rossi, M. Santoro, A.J. Dörr, M. Rizzoni (2004) Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research*, vol. 557: 119-129.

Dhawan A., M. Bajpayee, D. Parmar (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, vol. 25: 5-32.

Frenzilli G., M. Nigro, B.P. Lyons (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, vol. 681: 80-92.

Lee S., S. Kim, J. Choi (2009) Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 28: 86-91.

Ohe T., T. Watanabe, K. Wakabayashi (2004). *Mutagens in surface waters: a review*. *Mutation Research*, vol. 567: 109-149.

Park S.Y., J. Choi (2007) Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environmental International*, vol. 33: 817-822.

Pellacani C., A. Buschini, M. Furlini, P. Poli, C. Rossi (2006) A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquatic Toxicology*, vol. 77: 1-10.

Pickering A.D., J.P. Sumpter (2003) Comprehending endocrine disrupters in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, vol. 37: 331A-336A

Singh N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider (1991) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, vol. 175: 184-191



# BEHAVIOURAL ENDPOINTS IN *RUDITAPES PHILIPPINARUM* EXPOSED TO CONTAMINATED SEDIMENTS

by V. Moschino<sup>1</sup>, M. Cappello<sup>2</sup>, L. Da Ros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Marine Sciences, ISMAR – CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia, Italy  
vanessa.moschino@ve.ismar.cnr.it, luisa.daros@ve.ismar.cnr.it

<sup>2</sup>E-magine-it Srl, Solution for a Clear Vision, Via Greto di Cornigliano 6r, 16152  
Genova, Italy  
cappello@e-magine-it.it

---

**Abstract** - Sediment pollution has the potential to affect reburrowing behavior in infaunal organisms, thus the observed changes would be useful deployed in a toxicity bioassay for contaminated sediments. In this study the burrowing behavior of *Ruditapes philippinarum* has been evaluated exposing animals both to Cu-spiked sediments (100, 300 and 1000 µg Cu/g w.w.) and to natural sediments collected at differently impacted transitional and coastal sites. Exposure time was set at 48 h and changes in the re-burrowing behavior were evaluated through two different endpoints: RT50, i.e. time required for 50% of the organisms to burrow, and percentage of burrowed organisms at the end of exposure time. To this end, a specific software for continuous observations and quantitative analysis of the reburrowing rate has been developed. Results evidenced that both end-points were significantly affected by the micro-contaminant level in either spiked or natural sediments, confirming the suitability of reburrowing changes in *R. philippinarum* to be used as sensitive end-points in whole-sediment acute toxicity bioassay.

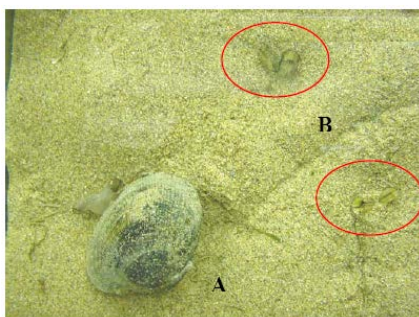
Keywords: toxicity bioassay, *Ruditapes philippinarum*, burrowing behavior

## **Introduction**

Anthropogenic disturbances may disrupt animal behavioural processes through impairing various metabolic/physiological activities (Zala and Penn, 2004). Changes in the reburrowing ability of aquatic infaunal invertebrates (i.e. variations in speed/time to dig into sediments) have been commonly observed as a reaction to environmental xenobiotics or physicochemical perturbations, and been considered an adaptive response, thus obviously of potential ecological relevance (Pearson et al., 1981; Doerding, 1982). On this basis, a rapid and short-term response bioassay (minutes to hours) has been developed and successfully used to assess sediment toxicity to bivalves, particularly clam species, both in field and laboratory exposure experiments (Phelps et al., 1985; Phelps, 1989; Shin et al., 2002; Matozzo et al., 2004). In this investigation, the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, an ideal species to be used in bioassays being tolerant to laboratory conditions, has been used as test organism to evaluate reburrowing responses to Cu-spiked sediments and to field sediments sampled from differently impacted transitional and coastal marine sites. A specific software for the continuous observation and for the quantitative analysis of the reburrowing rate has been also developed.

### **Materials and Methods**

The reburrowing test was performed according to Pearson et al. (1981) and Phelps (1989). Briefly, the sediment experimentally contaminated consisted of a natural reference sample which was spiked with a solution of  $\text{CuCl}_2$  (to obtain nominal concentrations of 100, 300 and 1000  $\mu\text{g Cu/g w.w.}$ ) according to the method of Simpson et al. (2004). The field sediments, sampled at two coastal sites along the Veneto coastline and in two estuarine areas within the Po Delta, were rapidly transferred to the lab and sieved through a 2 mm mesh to remove large shells or particles. For each sample, three replicates in three test tanks were then set up, each containing a 5 cm layer of sediment overlaid with 6-7 cm of aerated seawater. In each replicate, 10 clams were placed on the surface of the sediment.



*Fig. 1 – Unburied (A) and burrowed (B) experimental organisms.*

The test tanks were kept in a thermostatic room at the constant experimental temperature of 16°C, and the length of the experiments set at 48hrs. The number of clams which completely burrowed into the sediment was recorded using a web cam for continuous observation (Fig. 1). The camera was set to record one frame every 5 min for a period of 48 h. Animals were considered completely burrowed when their valves disappeared under the sediment surface (Da Ros et al. 2003). A negative control with standard sediments (SS) was also established. Two end-points were calculated at the end of the experiments: RT50, i.e. the time required for 50% of the organisms to burrow, and the total percentages of burrowed organisms. Chemical analyses of the most common contaminants, i.e. trace metals (Ar, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb),  $\Sigma\text{PAHs}$  and  $\Sigma\text{PCBs}$ , were also performed in the sediments collected from each sampling site. Preliminarily, a set of experiments had been carried out with artificial sediments to prove that reburrowing rate was unaffected by sediment grain size.

### **Results**

Reburrowing behaviour of clams exposed to spiked sediments showed significant relationships with increasing Cu concentrations, in relation to both the end-points evaluated. In particular, statistically significant differences were detected comparing the total percentage of burrowed organisms at 300 and 1000  $\mu\text{g Cu/g w.w.}$  (Mann-Whitney: \*  $p < 0.05$ ). RT50 values ranged from 41 min in control to 59 min at 300  $\mu\text{g Cu/g}$ ; no clams were burrowed at the highest Cu concentration.

As for the field sediments, the lowest percentage of reburrowed organisms was detected in clams exposed to the highest contaminated sediments, site Coast2 (Mann-Whitney: \*  $p < 0.05$ ). Similar trends were detected also for RT50 values, with significant differences observed in relation to the increasing contamination levels

(Mann-Whitney: \*  $p < 0.05$ ). The Spearman's correlation between each contaminant and either end-points resulted significantly negative between  $\Sigma$ PAHs,  $\Sigma$ PCBs and the %, and significantly positive between  $\Sigma$ PCBs and RT50.

### Discussion

The present research highlights the suitability of the reburrowing test with *R. philippinarum* as a sublethal sediment toxicity bioassay. Clams exhibited a clear dose-response when individuals were exposed to sediments spiked with Cu, with higher responsiveness in the percentage of reburrowed organisms at the end of the experimental time. Moreover, the bioassay has shown to be sensitive also to marine/estuarine sediments containing different levels of inorganic and micro-organic contaminants. Lastly, aiming at reaching the highest level of standardization, specific softwares for the continuous observation and for the quantitative analysis of the reburrowing rate have been set up (Fig. 2 A, B). A video-camera system coupled with an image-analyses software (VideoGrabber) was developed in our laboratory for improving the continuous recording of the reburrowing track. We are also developing a new software (VideoTracker) for automating quantitative evaluations of the reburrowing rate and speed.



Fig. 2 - Two screen shots of the developed softwares VideoGrabber (left) and VideoTracker (right).

### References

- Da Ros, L., Nesto, N., Nasci, C., Moschino, V., Pampanin, D., Marin, M. G., 2003. Biochemical and behavioural effects of hydraulic dredging on the target species *Chamelea gallina*. *Fisheries Research*, 64, 71–78.
- Doerding, P.H., 1982. Reduction of the sea star predation by the burrowing response of the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Estuaries* 5, 310–315
- Matozzo, V., Ballarin L., Marin M. G., 2004. Exposure of the clam *Tapes philippinarum* to 4-nonylphenol: changes in anti-oxidant enzyme activities and re-burrowing capability. *Marine Pollution Bulletin* 48: 563-571.
- Pearson, W. H., Woodruff, D. L., Sugarman, P. C., Olla, B. L., 1981. Effects of oiled sediment on predation on the littleneck clam, *Protothaca staminea*, by the Dungeness crab, *Cancer magister*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 13, 445–454.
- Phelps, H. L., 1989. Clam burrowing bioassay for estuarine sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 838–845.

- Phelps, H.L., Pearson, W.H., Hardy, J.T., 1985. Clam burrowing behaviour and mortality related to sediment copper. *Marine Pollution Bulletin* 16 (8), 309–313.
- Shin, P. K. S., A. W. M. Ng, Cheung, R. Y. H., 2002. Burrowing responses of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* to sediment contaminants. *Marine Pollution Bulletin* 45: 133-139.
- Simpson, S. L., Angel B. M., Jolley, D. F., 2004. Metal equilibration in laboratory-contaminated [spiked] sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests. *Chemosphere* 54(5): 597-609.
- Zala S.M., Penn D.J., 2004. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Animal Behavior* 68, 649-664.

# CRYO-ECOTEST: A NEW TOOL FOR THE ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF AQUATIC ENVIRONMENTS

by A. Fabbrocini<sup>a</sup>, R. D'Adamo<sup>a</sup>, F. Del Prete<sup>c</sup>, A. L. Langellotti<sup>b</sup>, F. Rinna<sup>c</sup>, R. Sessa<sup>b</sup>, F. Silvestri<sup>b</sup>, G. Villani<sup>b</sup>, V. Vitiello<sup>b</sup> and G. Sansone<sup>\*bc</sup>

<sup>a</sup> Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Lesina (FG), Italy - adele.fabbrocini@fg.ismar.cnr.it; raffaele.dadamo@fg.ismar.cnr.it

<sup>b</sup> Dip. Biologia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italy - giovanni.sansone@unina.it; raf\_sessa@yahoo.it; giovanni.villaniyyn6@alice.it; v\_valentina5095@libero.it

<sup>c</sup> CRIAcq - Centro Interdipartimentale di Ricerche per la Gestione delle Risorse Idrobiologiche e per l'Acquacoltura, Portici (NA), Università degli Studi di Napoli "Federico II", Italy - giovanni.sansone@unina.it; fdelprete78@libero.it; silvestrifauto@hotmail.com; francescarinna@virgilio.it; langello@unina.it

---

**Abstract** - A new approach in environmental studies has been investigated by authors, who propose the use of cryopreserved biological systems in ecotoxicological bioassays. Aim of this work has been the evaluation of the feasibility of sperm motility test using cryopreserved semen of the sea bream *S. aurata*, with sperm motility parameters as endpoint. Thawed sperm was incubated in environmental samples and in a reference toxicant; then motility was evaluated by videomicroscopy by both visual and computer assisted analyses. On the basis of the obtained results, the proposed bioassay could be a promising start-point for the development of toxicity tests more and more tailored to the needs of ecotoxicology and environmental quality evaluation strategies for aquatic environments.

Keywords: ecotoxicological test, sperm motility, cryopreservation, sea bream

## Introduction

Ecotoxicological bioassays using the gametes and embryos of aquatic species are commonly required in integrated environmental monitoring programs due to their high sensitivity to the synergistic and/or antagonistic effects of all components interacting with the biota. On the other hand, many factors limit the use of gametes and embryos in ecotoxicological tests: their availability, often limited to the spawning season, the difficulty in collecting, transferring and storing for long periods, and above all their biological variability [Paredes and Bellas, 2009; Schipper et al., 2008]. Cryopreservation is a biotechnology that provides on demand viable gametes and embryos of homogeneous quality, thus overcoming the main limitations in the use of some species in bioassays; in addition, cryopreserved biological systems could drastically reduce the use of animal models or whole organisms in performing ecotoxicological evaluations.

The sea bream *S. aurata* is a euryhaline species commonly found and intensively reared in the Mediterranean region; semen of this specimen is stored immotile in the

---

\* Corresponding author. Dip. Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, v. Mezzocannone 8, 80134 Napoli. Tel. +39 081 2534599; fax +39 081 2535090

gonads in relatively hypo-osmotic fluid and motility is triggered by sea water; the physiology of its sperm motility has been widely studied (Lahnsteiner et al., 2010) and sperm cryopreservation protocols are now available (Fabbrocini et al., 2000); in addition the sensitivity and reliability of sea bream cryopreserved semen has been previously tested in spermotoxicity test using Cd as reference toxicant (Fabbrocini et al., 2012). On these bases, aim of this work has been the evaluation of the sensitivity and reliability of sea bream cryopreserved semen using two environmental samples (sediment elutriate, dumpsite leachate) as tested matrices, in order to evaluate the feasibility of the CRYO-Ecotest: a spermotoxicity test performed using cryopreserved semen of the sea bream *S. aurata*, with sperm motility parameters as *endpoints*, that could allow evaluations for a wide range of aquatic ecosystems.

## ***Materials and methods***

### *Semen cryopreservation*

The semen was collected by abdominal stripping from adult male sea bream bred intensively. Samples found to have poor motility or contaminated by faeces or urine were discarded; subsequently, pools of semen were made up for every five best males. Semen was cryopreserved according to the procedure described in Fabbrocini et al. (2000). Briefly, semen was diluted at a ratio of 1:6 in 1% NaCl (motility inhibitor medium) containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), frozen at a gradient of 10 °C min<sup>-1</sup> to -150 °C, and finally immersed in liquid nitrogen up to 24 months.

### *Motility evaluation*

Straws were thawed at a rate of 15 °C sec<sup>-1</sup> and pooled (3 straws/pool). Sperm motility was activated by dilution in ASW (artificial sea water) 35‰, 18 °C (ASTM, 2004) at a final rate of 1:100 and assessed under videomicroscopy, with reference to indicators measured by both visual and computer-assisted analyses. For the visual analyses (VA) semen was diluted directly on an uncoated glass slide and observed by two trained workers; motility classes were scored as described in Fabbrocini et al. (2000); in order to monitor different cellular functions involved in the sperm motion process, four parameters were assessed: activation time (sec); highest motility class; highest motility class duration (min); total motility duration (min). The sperm velocity parameters, which are correlated to the fertilization ability of the semen (Beirão et al., 2011), were assessed by computer-assisted analyses (CA); immediately after activation semen was pipetted on to a multi-chamber counting slide and sperm tracks were recorded and analyzed by Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptic); the SCA acquisition parameters are reported in Fabbrocini et al. (2012). The following parameters were recorded: curvilinear velocity (VCL, µm sec<sup>-1</sup>); straight-line velocity (VSL, µm sec<sup>-1</sup>); average path velocity (VAP, µm sec<sup>-1</sup>); percentages of rapid sperm (RAP, curvilinear velocity above 100 µm sec<sup>-1</sup>).

### *Spermotoxicity test*

Dumpsite leachate sample was diluted at a rate of 1:1, 1:10, 1:100; 1:1000 in 1% NaCl. Sediment elutriate was extracted according to ASTM (1994) procedure and diluted at a rate of 1:1, 1:10, 1:100 in 1% NaCl. Scaled concentrations (0.01 to 100 ppm) in 1% NaCl of cadmium as Cd(II) solution were the reference toxicant. 1% NaCl was the control. Straws were thawed and pooled as previously described; semen samples were diluted 1:6 in the tested matrices and incubated at 4 °C up to 60 min. At the end of the incubation, sperm motility was triggered by dilution in ASW and the motion parameters were evaluated as previously described.

### Statistical analysis

Twelve independent trials were performed using different cryopreserved semen pools. Each test was run in triplicate. Prior to analysis, percentage data were arcsine square-root transformed. Data were tested for normality using Cochran's test and for homogeneity of variance using Shapiro-Wilk's test, and then analysed by one-way ANOVA. When significant effects were shown to occur, Dunnett's post-hoc test was performed.  $P < 0.05$  was considered to be significant. STATISTICA (8.0, 2008, StatSoft, Inc.) software was used for statistical analyses. For each tested sample toxicity was considered to occur when a significant difference vs control was recorded. In the case of the motility classes scoring, a one-class decrease was considered as significant.

### Results

The sperm motility parameter values recorded by both visual and SCA® assessment in cryopreserved semen on thawing are shown in Table 1.

Table 1. Values of the motility parameters recorded on thawing by visual (VA) and computer assisted (CA) analyses in cryopreserved sea bream *S. aurata* spermatozoa stored up to 24 months.

VA Parameters	Values	CA Parameters	Values
Activation time (sec)	60	RAP (%)	70.36 ± 7.49
Highest motility class	4,25	VCL (µm sec <sup>-1</sup> )	211.54 ± 29.20
Highest motility class duration (min)	20	VSL (µm sec <sup>-1</sup> )	142.28 ± 32.62
Total motility duration (min)	75	VAP (µm sec <sup>-1</sup> )	173.11 ± 23.79

In Tables 2 to 4 are reported the results of the spermiotoxicity tests carried out on the environmental matrices and on the reference toxicant solutions. For each of the eight evaluated parameters, significant differences in respect of the control were scored as a positive response of the *end point* and reported as "+" in the Table; the absence of significativity was classified as absence of toxicity and reported as "-" in the Table.

Results of the CRYO-Ecotest on reference toxicant (Cd) are reported in Table 2. Cadmium did not affect the activation time, which was similar to control up to 50 ppm exposure; also the total motility duration was slightly affected by Cd, as the first significant difference was recorded at 10 ppm. On the contrary, the highest motility level and its duration after activation showed to be more sensitive to the metal, proving to already significantly decrease after 1 ppm exposure. Similarly, the velocity parameters significantly decreased in respect of the control even at 0.1 ppm exposure.

Table 2. Differences vs the control (NaCl 1%) of the evaluating parameters recorded by visual (VA) and computer assisted analysis (CA) in cryopreserved sea bream semen after 60 min of incubation in the Cadmium solutions. Plus sign = significant difference; minus sign = not significant difference.

	significance vs control				
	0.1	1	5	10	50
Cadmium (ppm)					
Va parameters					

Activation time (sec)	-	-	-	-	+
Highest motility class	-	+	+	+	+
Highest motility class duration (min)	-	+	+	+	+
Total motility duration (min)	-	-	-	+	+
Ca parameters					
RAP (%)	+	+	+	+	+
VCL ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	+	+	+	+	+
VSL ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	+	+	+	+	+
VAP ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	+	+	+	+	+

Results of the CRYO-Ecotest on sediment elutriate samples are reported in Table 3. Again the activation time was not affected by elutriate exposure, even at the lower dilution rate (1:1); also the duration of total motility significantly decreased only at the 1:1 dilution rate; the highest motility level and its duration after activation showed to be again more sensitive, proving to significantly decrease at 1:10 and 1:100 dilution rates, respectively. As regard the parameters evaluated by SCA<sup>®</sup>, a significant decrease in the velocity values and in the percentage of rapid sperm was observed also at the highest dilution rate.

*Table 3. Differences vs the control (NaCl 1%) of the evaluating parameters recorded by visual (VA) and computer assisted analysis (CA) in cryopreserved sea bream semen after 60 min of incubation in the sediment elutriate solutions. Plus sign = significant difference; minus sign = not significant difference.*

elutriate (dilution rates)	significance vs control		
	1:100	1:10	1:1
Va parameters			
Activation time (sec)	-	-	-
Highest motility class	-	+	+
Highest motility class duration (min)	+	+	+
Total motility duration (min)	-	-	+
Ca parameters			
RAP (%)	+	+	+
VCL ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	+	+	+
VSL ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	+	+	+
VAP ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	+	+	+

Results of the CRYO-Ecotest on dumpsite leachate samples are reported in Table 4. Also in this case the highest motility level and its duration after activation proved to be the most sensitive among VA parameters, being affected even after incubation in samples at a dilution rate of 1:1000; on the other hand, dumpsite leachate samples impaired the activation time only at a dilution rate of 1:1. Even if a decrease in velocity parameters was observed also after incubation in 1:1000 diluted samples, significant differences in respect of the control for the CA parameters were recorded only for 1:10 and 1:100 diluted samples.



Table 4. Differences vs the control (NaCl 1%) of the evaluating parameters recorded by visual (VA) and computer assisted analysis (CA) in cryopreserved sea bream semen after 60 min of incubation in the dumpsite leachate solutions. Plus sign = significant difference; minus sign = not significant difference.

Dumpsite leachate (dilution rates)	significance vs control			
	1:1000	1:100	1:10	1:1
Va parameters				
Activation time (sec)	-	-	-	+
Highest motility class	+	+	+	+
Highest motility class duration (min)	+	+	+	+
Total motility duration (min)	-	+	+	+
Ca parameters				
RAP (%)	-	+	+	+
VCL ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	-	+	+	+
VSL ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	-	+	+	+
VAP ( $\mu\text{M sec}^{-1}$ )	-	+	+	+

## Discussion

Test organisms used in ecotoxicological bioassays need to meet some basic criteria: they should be ecologically relevant, easily available all year round, and should have well-known and above all homogeneous physiological responses. In addition, the relative endpoints should be selected so that they can be accurately, predictably and reliably measured (Chapman, 2002). As a previous research showed the feasibility of this proposed test using Cd as reference toxicant (Fabbrocini et al., 2012), in this study we evaluated whether the same positive results could be obtained with environmental matrices, where the synergic and/or antagonistic effect of several different pollutants, together with the presence of substances that act as confounding factors, may led to an unclear toxic response (Chapman, 2002; Losso et al., 2007).

The CA evaluation parameters (velocities and rapid sperm percentage) and the VA highest motility class and highest motility class duration parameters proved to be more sensitive to the environmental matrices in respect of the activation time parameter, according to what recorded after incubation in Cd. While the former ones reflect the physiological normality of cellular reactions involved in energy production, the latter mainly depends on the functionality of the cell membrane (Alavi and Cosson, 2006). Indeed, several classes of toxicants are known to affect spermatozoa mitochondrial *cristae* (Au et al., 2000) and to hamper fish sperm membrane, especially at level of water channels (Abascal et al., 2007) thus impairing sperm motility, according to our findings.

Spermiotoxicity tests on elutriate and pore water have long been used for the evaluation of the toxicity of sediment samples using as *end point* the sperm fertilization ability (Volpi Ghirardini et al., 1999); sperm motility parameters too have been successfully used as *end points* for the evaluation of sediment quality, with results comparable to those obtained with standardized bioassays (Fabbrocini et al.,

2010), and also in this case the evaluated parameters showed a good sensitivity even at the highest elutriate dilution rates.

Landfilling of solid waste is, unfortunately, a common management practice in many parts of the world, and also in our countries. Dumping leachates are known to contaminate groundwater supplies and surface water ecosystems (Biswas et al., 2010) and their effects on human health have been always more frequently highlighted (Martuzzi et al., 2009; De Felice et al., 2012). Therefore there is the need for “quick response” and “high sensitivity” tools for the risk assessment in these peculiar and highly contaminated environment. The CRYO-Ecotest showed a good dose-response effect also in presence of dumpsite leachate samples; as it can be easily optimized for more and more species from a range of environments, it could be of particular interest for the ecotoxicological evaluation of areas with intense environmental pressure due to wastes.

### ***Conclusions***

The CRYO-Ecotest is rapid and easy to perform; cryopreserved semen may be easily stored and transferred, making it possible to perform all-year-round bioassays in different sites or at different times with the same batch of semen. In addition, no larval and juvenile stages are involved in the test and for semen collection fishes are not sacrificed, thus avoiding ethical concerns. Finally, considering the high number of aquatic species for which cryopreservation protocols have been standardized, the CRYO-Ecotest can be considered a “universal” ecotoxicological bioassay for aquatic environments (marine, brackish and freshwater), as it could easily be extended to species, both vertebrates and invertebrates, from a range of different environments, meeting the need for ecologically relevant biological indicators. In addition, it does not need for a specially equipped facility, since it can even be performed as part of in-the-field monitoring programs.

All these considered, the proposed bioassay could be a promising start-point for the development of toxicity tests more and more tailored to the needs of ecotoxicology and environmental quality evaluation strategies, also in the view of a significant reduction in the use of animal models in toxicological and ecotoxicological bioassays.

### ***References***

- Abascal F.J., Cosson J., Fauvel C. (2007) Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *J. Fish Biol.* 70: 509-522.
- Alavi S. M. H., Cosson, J. (2006) Sperm motility in fishes: (II) effects of ions and osmotic pressure: a review. *Cell Biology International* 30: 1–14.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 2004. Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. In: *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, PA, E 1563-04, pp.18.
- Au D.W.T., Chiang M.W.L., Wu R.S.S. (2000) Effects of cadmium and phenol on motility and ultrastructure of sea urchin and mussel spermatozoa. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 38: 455-463.
- Beirão J., Cabrita E., Pérez-Cerezales S., Martínez-Pánaramo S., Herráez M.P. (2011) Effects of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiol.* 62: 22-31.
- Biswas A.K., Kumar S., Babu S.S., Bhattacharyya J.K., Chakrabarti T. (2010) Studies on environmental quality in and around municipal solid waste dumpsite. *Resources, Conservation and Recycling* 55: 129-134.

Chapman P.M. (2002) Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 7-15.

De Felice B., Nappi C., Zizolfi B., Guida M., Di Spiezio A., Bifulco G., Guida M. (2012) Telomere shortening in women resident close to waste landfill sites. *Gene* 500: 101-106.

Fabbrocini A., Lubrano Lavadera, S. Rispoli, S. Sansone, G. (2000) Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiol.* 40, 46-53.

Fabbrocini A., Di Stasio M., D'Adamo R. (2010) Computerized sperm motility analysis in toxicity bioassays: A new approach to pore water quality assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 1588-1595.

Fabbrocini A., D'Adamo R., Del Prete F., Langellotti A.L., Rinna F., Silvestri F., Sorrenti G., Vitiello V., Sansone G. (2012). Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: sensitività and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84: 293-298.

Lahnsteiner F., Mansour N., Caberlotto S. (2010) Composition and metabolism of carbohydrates and lipids in *Sparus aurata* semen and its relation to viability expressed as sperm motility when activated. *Comp. Biochem. Physiol.* 15B: 39-45.

Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Marchetto D., Pantani C., Ghetti P.F., Volpi Ghirardini A. (2007) Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66: 252-257.

Martuzzi M., Mitis F., Biggeri A., Terracini B., Bertollini R. (2002). Environment and health status of the population in areas with high risk of environmental crisis in Italy. *Epidemiol. Prev.* 26: 1-53.

Paredes E., Bellas F. (2009) Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies. *Cryobiol.* 59: 344-350.

Schipper C.A., Dubbeldam M., Feist S.W., Rietjens I.M.C.M., Tinka Murk A. (2008) Cultivation of the heart urchin *Echinocardium cordatum* and validation of its use in marine toxicity testing for environmental risk assessment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 364: 11-18.

Volpi Ghirardini A., Birkemeyer T., Arizzi Novelli A.M., Delaney E., Pavoni B. and Ghetti P.F. (1999). An integrated approach to sediment quality assessment: the Venetian lagoon as a case study. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 2: 435-447.

# EPHYRA JELLYFISH AS A NEW MODEL FOR ECOTOXICOLOGICAL BIOASSAYS

by E. Costa<sup>a</sup>, M. Beltrandi<sup>b</sup>, E. Bongiovanni<sup>b</sup>, F. Garaventa<sup>a</sup>, G. Gnone<sup>b</sup>, G. Greco<sup>a</sup>, S. Lavorano<sup>b</sup>, V. Mazzola<sup>a</sup>, V. Piazza<sup>a</sup>, M. Faimali<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Marine Sciences, National Research Council, Genova, Italy – elisa.costa87@libero.it francesca.garaventa@ismar.cnr.it marco.faimali@ismar.cnr.it, piazza@ge.ismar.cnr.it,

<sup>b</sup> Acquario di Genova, Area Porto Antico, Ponte Spinola Genova Italy – ebongiovanni@costaedutainment.it, mbeltrandi@costaedutainment.it, slavorano@costaedutainment.it, ggnone@costaedutainment.it,

---

**Abstract** - The aim of this study was a preliminary investigation on the possibility of using the Ephyra of *Aurelia aurita* (Cnidaria) as an innovative model organism in ecotoxicology.

A series of sequential experiments were carried out in the laboratory; the results obtained in each test was as a basis to improve the sequent one. In the first phase experiments were aimed to measure the frequency of pulsations and the consequent alteration of Ephyra sinking rate using it as ecotoxicological end-point. This analysis was based on observations and counts (pulses of Ephyra) by an operator through a system of dynamic exposure and by an automatic recording system (swimming behavioral recorder system; SBR) already used previously for other marine organisms. The experimental investigation highlighted two different behavioral end-points. At same time it has been possible optimize the methodology of static exposure for the organisms under evaluation allowing the measurement by using SBR. In the second step exposed ephyre to different concentrations of a reference toxic to investigate the acute response as mortality.

Keywords: jellyfish, ephyra, swimming speed, bioassay

## *Introduction*

The use of different marine organisms responses to stress is a widely recognized method in ecotoxicological assessment of the marine environment. They are used as biological models in different bioassays to assess the impact of pollutants thus quantifying their answerers to source of stress exposure in laboratory using different end-point.

The aim of this work is to extend the ecotoxicological investigation to other organisms different from those today commonly tested (mainly, algae, crustaceans, mollusks etc.). Actually, in fact, there are no bioassays based on the use of jellyfish as a biological model. The idea arises in collaboration with the Aquarium of Genoa, where it has been observed that these organisms show a fast reaction under stress

The evaluation of the potential of these organisms to became a model organism for ecotoxicological studies has been performed through different experimental tests all aimed to study the jellyfish swimming performance and its changes in presence of stress in order to find a sensitive a reliable end-point. Experiments have been performed both by direct observation of Ephyra motion and by an automatic

recording system and videographics analysis using an automated system developed by ISMAR CNR (Swimming Behavioral Recorded - SBR) previously used with other marine organisms (Garaventa et al., 2010; Faimali et al., 2012).

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

The ephyra of the Scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758), the common moon jellyfish have been used in this work; it is a cosmopolitan species with a worldwide distribution in neritic waters between 70° N and 40° S (Kramp, 1961; Russell, 1970). *Aurelia aurita* has two main stages in its life cycle, the polyp stage (asexual reproduction) and the medusa stage (sexual reproduction). Polyps produce additional ephyra by strobilation. Ephyra have been received directly from the Genoa Aquarium where they are constantly bred. Once in CNR laboratory ephyra have been kept in the thermostatic room in 15 L aerated tanks containing natural sea water.

#### *Experimental activities*

##### *1 Evaluation of the frequency of pulsation and of the rate of sinking by direct operator observation.*

The exposition container was a graduated cylinder 1000ml of volume, filled with 0.22 µm filtered sea water (20 ° C and 30 ‰ salinity, the same of breeding water). The observations were done under normal ambient light room conditions. Each ephyra was collected from the breeding tank using a Pasteur plastic pipette and placed on the surface of the cylinder water; at the same time, the operator start to record with a chronometer the time needed to the ephyra to reach the cylinder bottom. During the sinking also the pulsations number have been recorded. Ephyra were starved from 24 hours before the test to avoid weight influence on the sinking speed caused by different food ingestion. For each individual sinking rate (mm / minute) and the pulsation rate (pulse / minute) have been calculated obtaining the rate of sinking (Rs) and the frequency of pulses (Fp) values.

##### *2 Automatic registration of the frequency pulsation (Fp) using the Swimming Behavior Recorder (SBR)*

The SBR system was developed by ISMAR CNR. It is an advance technological system for measuring the behavioral swimming already used for other marine organisms. (M. Faimali et al 2006)

##### *Experiment 2a - Frequency of pulsation recording time definition.*

Five ephyra were placed in 4mL of 0.22 µm filtered sea water (20 ° C and 30 ‰ salinity, the same of breeding water) inside a polyester multi-well plates. Four different recording times have been tested, thus to find the correct ratio between tape length and ephyra frequency pulsation: 15, 20, 30 and 60 seconds.

Each well was recorded by SBR and for each ephyra have been calculated the frequency pulsation (Fp) at the four different times.

##### *Experiment 2b - Analysis on organisms density, volume variation and light exposition effect.*

After the first step an increasing number of ephyra (2, 4, 8 and 12 for each well) have been exposed in a multi-well plates in 0.22 µm filtered sea water (S= 30‰) in three different volumes (1, 2 and 4 mL for each well).

Plates have been kept in thermostatic room at 20 °C for 24h. The experiment has been prepared in double: one series has been maintained with a 16 h light, 8 h dark, the second one stayed in dark condition. After 24 h, the number of pulsation for each ephyra was analyzed using the SBR system setting the recording time at 60. seconds.

### 3 Exposed toxicity test using static exposure

In this experiment was performed to investigated the mortality and as sub-lethal effect the frequency of pulsation (Fp).

Five ephyra were exposed in to multi-well plates, each containing 4 mL of different concentrations (0; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L) of the Cadmium Nitrate (can be found numerous toxicity data in literature ). For each concentration ( 3 replica) 15 ephyra were exposed. Plates were incubated at  $20 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  for 6 and 24 h in a dark condition.

Then the ephyra have been recorded by SBR for 60 seconds evaluating the mortality and frequency of pulsation.

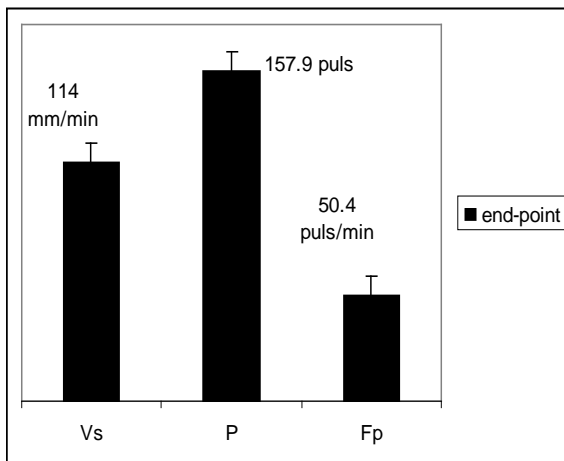
Ephyra were considered dead when they don't pulse and do not move any appendages for 60 seconds of observation.

## Results

*Experiment 1 - Evaluation of the frequency of pulsation and of the rate of sinking by direct operator observation.*

Pulsations numbers for each ephyra during the sinking along the graduated cylinder have been calculated.

These values were then to assess the behavioral end-point as frequency pulsations (Fp) and the speed of sinking (Rs).



*Fig 1. Average values ( $m \pm se$ ;  $n=10$ ) of pulsation (P) frequency of pulsation (Fp) and the rate of sinking (Rs).*

*Experiment 2a - Recording the frequency of pulsation by SBR*

The first analysis of the swimming behavior by SBR system (Table 1) has allowed to identify the times necessary for quantifying a value of pulsation frequency comparable with the method of direct observation (Fig 1).

Table 1. The frequency of pulsation (Fp) of each ephyra at four different time of SBR recording.

<i>Aurelia aurita</i>				
Ephyre	Fp 15 sec	Fp 20 sec	Fp in 30 sec	Fp in 60 seconds
1	9	9	6	52
2	2	4	11	48
3	4	4	10	43
4	3	5	16	67
5	2	3	10	55
6	2	2	1	71
7	1	0	10	56
8	4	0	7	44
9	2	5	12	38
10	6	4	16	25
<b>M</b>	<b>3,5</b>	<b>3,6</b>	<b>9,9</b>	<b>50</b>
s.d	2,41	2,43	4,5	13,55
s.e	0,76	0,83	1,42	6,02

Than by SBR have been calculated the pulsations number at 60 seconds (frequency of pulsations) for each ephyra exposed in the well in three different volume and in double keeping conditions: in a photoperiod and dark.

*Experiment 2b - Analysis on organisms density, volume of exposition and light/dark effect on frequency pulsation*

Table 2. Frequency of pulsation of each ephyra in the well, measured by SBR. The recording time was 60 seconds.

Vassel volume	Exposition	<i>Aurelia aurita</i> (number ephyra)			
		2	4	8	12
		Frequency of pulsation (puls/min)			
1 mL	Light	11	9	7	10
	Dark	43	30	13	16
2mL	Light	16	9	7	10
	Dark	35	23	17	16
4mL	Light	16	13	8	11
	Dark	42	27	16	18

Experiment 3. Toxicity test using static exposure.

The toxicity test has provided an exposure time of ephyra at 6 and 24 h and could be assessed the frequency of pulsations (Fp) by SBR as a behavioral end-point. The EC50 values for 6 and 24 h of exposition are reported in Table 3.

Table 3. The value EC50 of to get at 6 and 24 hours.

Hours of exposition	EC <sub>50</sub> (mg/L)
6 h	3,16
24 h	0,32

## Discussion

That is a preliminary study of the ephyra swimming behavioral, some authors wrote in fact that they do not just float passively (as plancton) but have a behavioral response on (Rakow and Graham, 2006; Frost, 2010). The first experiment showed the possibility of quantifying easily and correctly two end-points behavioral as the frequency of pulses (Fp) and the rate of sinking (Rs) Movie recording with the current version of the SBR system, much more practical, do not allow swimming vertical ephyra but only the frequency of pulsations in space limited.

Comparing the frequency of pulsations by direct observation and by SBR would seem that the optimal time to recording both that of 60 seconds.

After has been valued effect on the ephyra swimming behavior to varying some parameters for the measurement by SBR to standardize the methodology of ephyra exposure. From the data obtained it is possible to observe how the different types of maintenance of Ephyra before recording (photoperiod, dark) affects considerably the number of pulsations. It would seem that the swimming behavior is strongly influenced by a condition of stress (interpretation of an increased number of pulsations) due to the permanence for a time of 24 h in the dark, compared to a situation of exposure to a photoperiod. Another important observation, was that the number of ephyra exposed in each well, it would seem that as the number every individual is brought to decrease its pulsations probably due to a decrease of the available space. Of course this trend is much more evident for ephyre exposed the dark condition. Comparing the data obtained in the first experiment would not seem to be no obvious differences on the number of pulses between the direct observation and method that provides for the use of the SBR (60 seconds) but in the future it will be possible to optimize the system with the ability to measure the pulse frequency, and the rate of sinking in an automatic way, with further adjustment on the recording time. They aren't any data of reference for this new biological model, so we cannot be any comparison to assess the overall sensitivity and validity of the behavioral end-point.

But it was possible used the frequency of pulsations and compared it with the data of LC<sub>50</sub> obtained with different marine organisms exposed to Cadmium Nitrate found in literature. (table 4)

Table 4. LC<sub>50</sub> values in marine organisms exposed at Cadmium Nitrate report in literature

Marine Organism	Specie	Exposure time	LC <sub>50</sub> (mg/L)	References
Cnidaria	<i>Aurelia aurita</i>	24 h	0,38	This study
Crustaceans	<i>Tigriopus brevicornis</i>	96 h	0,47	Forget et al.(1998)



Crustaceans	<i>Balanus amphitrite</i>	48 h	0,49	Piazza et al.[2012]
Crustaceans	<i>Homarus americanus</i>	96 h	7,8	Johanson et al.[1979]
Mollusc	<i>Anadara granosa</i>	96 h	320	Patel et al.[1991]
Mollusc	<i>Perna indica</i>	96 h	192	Baby et al. [1987]
Bacteria	<i>Vibrio fisheri</i>	22 h	0,22	Radix et al.[1999]
Fish	<i>Baleophthalmus dussumieri</i>	96 h	640	Manoj et al.[1999]
Rotifers	<i>Brachionus plicatilis</i>	24 h	39	Snell et al. [1991]

The ephyra values of  $EC_{50}$  (Table 3) suggest a good sensibility for this experimental model showing a value at 24h of comparable exposure with those least value found with other sea invertebrates.

### Conclusions

The results of this work pointed out that quantification of the behavioral responses (frequency of pulsations) in ephyra is an easily measurable end-point; furthermore, this end-point can be quantify using an automated system even if it will be necessary to set the SBR system in order to improve the output..

Finally, as already said before, the results of the exposure to the reference toxic underline that jellyfish are a promising model organisms for ecotoxicological investigation.

### References

- Baby, K.V. and N.R. Menon. 1987. Salt forms of metals and their toxicity in the brown mussel *Perna indica* [Kuriakose and Nair]. Indian J. Mar. Sci. 16(2): 107-110
- Faimali M., Garaventa F., Piazza V., Magillo F., Greco G., Corrà C., Giacco E., Gallus L., Falugi C. (2006) - Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. Marine Biology, 149: 87-96.
- Forget, J., Pavillon, J.F., Menasria, M.R., Bocquene, G., 1998. Mortality and LC50 Values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. Ecotoxicol. Environ. Saf.40, 239-244.
- Garaventa F., Gambardella C., Di Fino A., Pittore M., Faimali M. (2010). Swimming Speed Alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a Sub-Lethal Behavioural End-Point for Ecotoxicological Surveys. Ecotoxicology, 19: 512-519.
- M. W. Johnson and J. H. Gentile, 1979. *Acute toxicity of cadmium, copper, and mercury to larval American lobster Homarus americanus*. Bull. Environm. Contam. Toxicol:22:258-264
- Kramp PL (1961) Synopsis of the medusae of the world. Journal of Marine Boil Assessment UK 40: 1-469.
- Piazza V. , A. Ferioli , E. Giacco , N Melchiorre , A Valenti , F Del Prete , F Biandolino , L Dentone , P Frisenda , M Faimali . A standardization of *Amphibalanus (Balanus) amphitrite* (Crustacea,Cirripedia) larval bioassay for ecotoxicological

studies."Ecotoxicology and Environmental Safety 2012 vol 79: 134-138.

Radix, P, Leonard, M; Papantoniou, C; Roman, G ; Saouter, E Gallotti-Schmitt, S ; Thiebaud, H ; Vasseur, P.; Anthony K. (1991) Comparison of *Brachionus calyciflorus* 2-D and Microtox (R) chronic 22-h tests with *Daphnia magna* 21-d test for the chronic toxicity assessment of chemicals Environmental Toxicology and Chemistry Volume: 18 Issue: 10 Pages: 2178-2185 DOI: 10.1897/1551-5028(1999)018<2178:COBCDA>2.3.CO;2 Published: OCT 1999

Rakow Kelly C, Graham William (2006) Orientation and swimming mechanics by the scyphomedusa *Aurelia* sp. in shear flow. Limnology Oceanography, 51: 1097-1106.

Russell FS (1970) The medusae of the British Isles. II. Pelagic Scyphozoa with a supplement to the first volume on Hydromedusae. Cambridge University Press, London, p 284.

# SVILUPPO ED INTEGRAZIONE DI ANALISI CHIMICHE, DI INDICI BIOTICI, BIOLOGICI, BIOCHIMICI ED INDAGINI ULTRASTRUTTURALI PER LA VALUTAZIONE DELL'IMPATTO AMBIENTALE DI STRUTTURE OFFSHORE PER L'ESTRAZIONE DI IDROCARBURI NELLE ZONE MARINE COSTIERE

di A. Gomiero<sup>a,b</sup>, A. Negri<sup>c</sup>, A. De Biasi<sup>c</sup>, L. Kozinkova<sup>c</sup>, P. Polidori<sup>c</sup>, E. Punzo<sup>c</sup>, A. Santelli<sup>c</sup>, P. Strafella<sup>c</sup>, A. Spagnoloa, M. Girasole<sup>d</sup>, S. Dinelli<sup>c</sup>, C. Nasci<sup>c</sup>, A. Viarengo<sup>e</sup>, G. Fabi<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Scienze Marine (ISMAR), largo Fiera della Pesca 1, 60125 Ancona, Italy

<sup>b</sup> Dipartimento di Scienze ed Innovazione Tecnologica (DISIT), Università del Piemonte Orientale, Via T. Michel 11, 15121 Alessandria, Italy

<sup>c</sup> Centro Italiano di Biologia Marina (CIBM), via N. Sauro 4, 57128 Livorno, Italy

<sup>d</sup> Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Struttura della Materia (ISM), Fosso del Cavaliere 100, 00133 Roma, Italy

<sup>e</sup> Thetis S.p.A. Castello 2737/f, 30123 Venezia, Italy

---

**Abstract** - Il piano di sviluppo energetico adottato dal governo italiano all'indomani del secondo dopoguerra ha prodotto, a partire dagli anni 60, il crescente aumento dello sfruttamento delle risorse naturali ivi compresi i giacimenti marini di combustibili fossili. Italia si è in seguito verificata una crescente sensibilizzazione verso le problematiche ambientali e verso il concetto di sfruttamento sostenibile delle risorse. Negli ultimi anni, è stato dato un notevole impulso anche agli aspetti legislativi finalizzati a rendere obbligatoria la procedura di valutazione d'impatto ambientale per le attività di sfruttamento di giacimenti di gas e petrolio. In tale contesto il CNR-ISMAR di Ancona, coadiuvato da alcuni operatori specializzati, ha sviluppato, a seguito dell'esperienza pluriennale nel settore, un monitoraggio interdisciplinare per valutarne gli effetti sull'ecosistema marino. Il piano di monitoraggio ha incluso lo studio fisico, chimico ed ecotossicologico dei sedimenti e del popolamento bentonico associato, descrittore chiave nelle valutazioni dello stato di qualità dell'ambiente. Il piano ha previsto anche la messa a punto di una batteria di indici subletali di stress ai diversi livelli di organizzazione biologica compresa quello ultrastrutturale su bivalvi al fine di correlarle le risposte biologiche con la reale biodisponibilità di sostanze inquinanti.

Parole chiave: Piattaforme, biomarkers, sedimenti, bioassays, metalli, comunità bentoniche

## *Introduzione*

Il piano di sviluppo energetico adottato dal governo italiano all'indomani del secondo dopoguerra ha prodotto, a partire dagli anni 60, il crescente aumento dello sfruttamento delle risorse naturali ivi compresi i giacimenti marini di combustibili

fossili. Ciò ha interessato in modo particolare il mare Adriatico, dove, nel solo distretto centro-settentrionale sono attualmente decine di piattaforme per l'estrazione del gas metano. Al fine di perseguire il maggior rispetto per l'ambiente e lo sfruttamento sostenibile delle sue risorse, il legislatore italiano ha nel tempo emanato regolamenti e norme che hanno reso obbligatoria la procedura di valutazione d'impatto ambientale per le attività legate alla trivellazione ed installazione di strutture off-shore per lo sfruttamento di giacimenti di gas e petrolio. A tal fine il CNR-ISMAR di Ancona, coadiuvato dal Centro Italiano di Biologia Marina, dal DISIT dell'Università del Piemonte Orientale e dall'Istituto Thetis S.p.A., ha sviluppato un monitoraggio chimico-biologico pluriennale teso a valutarne gli effetti indotti nell'ecosistema acquatico. Il programma ha previsto la quantificazione delle principali classi di inquinanti ambientali nei sedimenti a cui è stata affiancata l'analisi ecotossicologica tramite biosaggi, la valutazione dei principali descrittori della comunità bentonica, la messa a punto di una batteria estesa di indici subletali di stress ai diversi livelli di organizzazione biologica (subcellulare, cellulare, biochimica, molecolare e fisiologico) in *M. galloprovincialis* tesi a valutare lo stato di salute generale degli organismi, ad accertare i danni legati allo stress ossidativo o la identificazione di risposte biologiche imputabili alla presenza di specifiche classi di inquinanti. Le risposte biologiche sono state, inoltre, integrate sia con i livelli delle principali classi di inquinanti organici ed inorganici, sia con i risultati di indagini ultrastrutturali tramite microscopia elettronica su alcuni tessuti target al fine di correlare le alterazioni osservate con la reale biodisponibilità di sostanze inquinanti.

### ***Materiali e Metodi***

I siti di campionamento impiegati per le indagini sui livelli di inquinanti e l'ecotossicità nei sedimenti e delle alterazioni a carico della comunità bentonica sono stati posizionati lungo due transetti ortogonali posizionati da NW a SE e tra NE e SW. In particolare quattro siti sono stati collocati in corrispondenza della piattaforma di proprietà di ENI S.p.A. "AnnaMaria B", seguiti da quattro posizionati a 30, 60, 120 e 250 m dalla stessa mentre i siti di controllo sono stati posti a 2 km dalla piattaforma (K1, K2, K3 e K4; fig.1). I primi 2 cm dei sedimenti destinati alle analisi chimiche sono stati prelevati tramite box corer; diversamente i campioni utilizzati per le indagini ecotossicologiche e lo studio delle comunità bentoniche sono stati prelevati tramite la benna di Van Veen (capacità: 12 l; apertura: 0,095 m<sup>2</sup>). Le indagini ecotossicologiche sono state condotte su un ristretto numero di campioni corrispondenti al 30% dei campioni totali come previsto dal protocollo ISPRA (ISPRA, 2011). Il piano di campionamento ha previsto due campagne di monitoraggio semestrali (estate 2010 ed inverno 2011) poco dopo l'installazione della piattaforma.

### ***Analisi chimiche***

L'analisi tessiturale dei sedimenti è stata effettuata secondo la classificazione Udden-Wentworth. Per la quantificazione dei metalli la mineralizzazione dei campioni è stata effettuata mediante un sistema di digestione a microonde seguendo la metodica EPA 6010C, mentre per As, Cd, Pb l'analisi è stata condotta mediante AAS seguendo metodica EPA 7010. Per la determinazione del Hg l'analisi è stata condotta seguendo metodica EPA 7473. L'accuratezza delle procedure di digestione e di analisi dei campioni è stata verificata impiegando i materiali standard di riferimento (LGC 6137 o MESS-3). Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono stati determinati tramite i metodi EPA 3545a: 2007 e 3620C:2007. L'analisi del bioaccumulo di inquinanti è stata condotta seguendo le metodiche standard EPA 3545 e 8310 per i composti organici: idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed alifatici (IA). I metalli (Zn, Cd, Pb e As) sono stati determinati tramite la metodica EPA 6020a. L'analisi del

bioaccumulo di inquinanti è stata condotta seguendo le metodiche standard EPA 3545 e 8310 per i composti organici: idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed alifatici (IA). I metalli (Zn, Cd, Pb e As) sono stati determinati tramite la metodica EPA 6020a.

#### *Analisi ecotossicologiche*

La valutazione dell'inibizione della bioluminescenza sul batterio *Vibrio fischeri* è stata stimata attraverso il protocollo Solid Phase Test (SPT) con procedura Large Sample Method di Azur Environmental (1994). La relazione dose risposta è stata elaborata mediante software dedicato Microtox OmniTM v 1.16. Il saggio effettuato con esemplari di *Corophium orientale* è stato allestito secondo il protocollo ISO 16712:2005[E], mentre il test di accumulo con il polichete *Hediste diversicolor* è stato condotto seguendo i protocolli ASTM E1688-97a (riapprovato nel 2007) e EPA 600/R-93/183: 1993.

#### *Indici di stress subletale su bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*)*

Gli organismi sono stati prelevati, in estate ed inverno, presso un sito di controllo posizionato nel parco naturale del monte Conero (An) e vicino e lontano l'anodo di sacrificio di una piattaforma per l'estrazione di gas naturale localizzata 30 miglia a SW da Ancona. Gli animali sono stati selezionati in base alla taglia ( $4.5 \pm 0.5$  cm) e sottoposti ad analisi biologiche e chimiche. Lo stato di stress fisiologico degli individui è stato determinato misurando il test di sopravvivenza in aria. Il danno genetico è stato valutato in cellule dell'emolinfa dei mitili determinando la frequenza di micronuclei (Bolognesi et al., 1999) ed il danno al DNA tramite il test della cometa. Lo stress ossidativo è stato valutato come contenuto intra-citoplasmico di malondialdeide su un pool di ghiandole digestive ma anche come contenuto intra-lisosomiale di lipofuscine su sezioni sottili di ghiandola digestiva ottenute al criostato. Su sezioni analogamente realizzate è stato quantificato inoltre: il livello di lipidi neutri e la stabilità delle membrane lisosomiali (Moore et al., 1988). Come indice di stress di esposizione specifico ai metalli pesanti è stato valutato il contenuto di metallotioneine (MT) nella ghiandola digestiva (Viarengo et al., 1989) e l'espressione genica tramite PCR quantitativa attraverso il dosaggio di geni specifici l'MT10 ed MT20 secondo il metodo Dondero et al., (2006). Aliquote di tessuto gonadico e della ghiandola digestiva proveniente da 5 esemplari sono state prelevate per le successive indagini microscopiche AFM/TEM/SEM (Girasole et al., 2007, 2012).

#### *Indagini ultrastrutturali*

I campioni destinati alle caratterizzazioni con microscopia ottica e microscopia SEM sono stati inclusi in paraffina e per essi è stato utilizzato come fissativo il liquido di Bouin. I campioni riservati alle caratterizzazioni AFM sono, invece, stati inclusi in resina epossidica che risulta più appropriata per ottenere sezioni più sottili. Per questi ultimi il fissativo utilizzato è stata una soluzione di glutaraldeide seguita da una post-fissazione con tetrossido di osmio. I campioni vengono Per effettuare l'inclusione in paraffina o resina e per ottenere il campione finale pronto per l'analisi AFM e per l'analisi SEM, è stato eseguito un procedimento di disidratazione con soluzioni a concentrazione crescente di etanolo. Al processo di disidratazione l'infiltrazione dei campioni con opportune resine polimeriche ed il taglio. Le misure di microscopia AFM sono state eseguite su sezioni istologiche provenienti da tessuti inclusi in resina epossidica e tagliate con un ultramicrotomo in sezioni sottili dello spessore di circa 200 nanometri. La caratterizzazione dei campioni è stata effettuata in massima parte in modalità "contact" e tramite misure di friction force per identificarne le eventuali particelle metalliche presenti al loro interno. Alcuni raffinamenti delle indagini sono state eseguite utilizzando la modalità di acquisizione di tapping. Per

l'analisi SEM le sezioni, di 4-8 micron incluse in paraffina e non colorate, sono state depositate su un substrato conduttore e sul quale sono state successivamente sottoposte ad un semplice processo di rimozione e dissoluzione della paraffina.

*Indici sulla comunità macrobentonica: applicazione di indici biotici*

Per ogni sito d'indagine sono state prelevate sei repliche. Il materiale è stato setacciato tramite un setaccio con maglia da 0,5 mm e fissato in formalina al 5%. Una volta in laboratorio si è proceduto al sorting e all'identificazione al più basso livello tassonomico possibile tramite microscopio ottico e stereo microscopio. Gli individui appartenenti allo stesso taxon sono stati contati e pesati ed i valori ottenuti rapportati alla superficie della benna. I dati ottenuti hanno permesso il calcolo dei seguenti indici: Abbondanza "N"; Indice di Dominanza "D" (May, 1979); Ricchezza Specifica Totale "S" (Pielou, 1974); Ricchezza Specifica Media "Sm"; Diversità Specifica di Shannon-Weaver "H'" (Pielou, 1974). Per valutare lo stato ecologico dell'area sono stati confrontati i risultati di tre differenti indici quali l'indice W (Clarke e Warwick, 1994), l'AMBI ed il BENTIX (Borja, 2000), seguendo quanto suggerito da Teixeira (2007).

**Risultati**

*Analisi chimiche*

Nel periodo dell'indagine i contaminanti ricercati hanno conservato concentrazioni modeste, sebbene non siano mancate anomalie. Nel corso della prima campagna di studio sia la sostanza organica come alcuni metalli e hanno evidenziato incrementi in corrispondenza del sito A5 distante 30 m in direzione SE dalla piattaforma. Nell'inverno 2011 la maggior parte delle anomalie sono scomparse ad indicare un generale recupero dell'area. Il segnale di impatto più significativo è rimasto il livello di Ba che ha esibito concentrazioni più elevate in diversi siti con un picco nei pressi della piattaforma (lato SE) sebbene molto inferiore a quello registrato nel corso delle precedenti campagne. Anche il Cu evidenzia livelli più elevati rispetto ai controlli a 30 m da struttura in direzione SE. Ciò tenderebbe ad indicare una modesta diffusione di Cu in quella direzione. Per quanto riguarda lo zinco si registra, nell'ultimo survey, una riduzione dei picchi osservati nell'estate 2010, ma i valori rimangono leggermente superiori ai controlli, indicando nel complesso una tendenza alla diminuzione in tutti i siti e nel periodo considerato.

*Analisi ecotossicologiche*

I risultati dei test condotti sui sedimenti analizzati tendono ad escludere la presenza di un effetto eco tossico acuto sulle specie testate (tab. 1). In particolare si riporta una scarsa inibizione della bioluminescenza di *V. fischeri* ed uno scarso effetto di mortalità sia sull'anfipode *C. orientale* e sul polichete *H. diversicolor*.

*Tab 1 Risultati delle indagini eco tossicologiche nei sedimenti analizzati.\*Scala tossicità secondo il manuale ICRAM -APAT, 2006*

Stima tossicità da saggi ecotossicologici *						
Inverno 2010				Estate 2011		
Campione	<i>V.fischeri</i>	<i>H.diversicolor</i>	<i>C. orientale</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>H. diversicolor</i>	<i>C. orientale</i>

AM SE	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
A3	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
A6	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
A8	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
B3	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
B6	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
K1	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
K3	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente

### Indici di stress subletale su bivalvi (*M. galloprovincialis*)

L'applicazione della batteria di biomarkers riporta una scarsa sindrome di stress negli organismi prelevati presso la piattaforma AnnaMaria B (fig. 1).

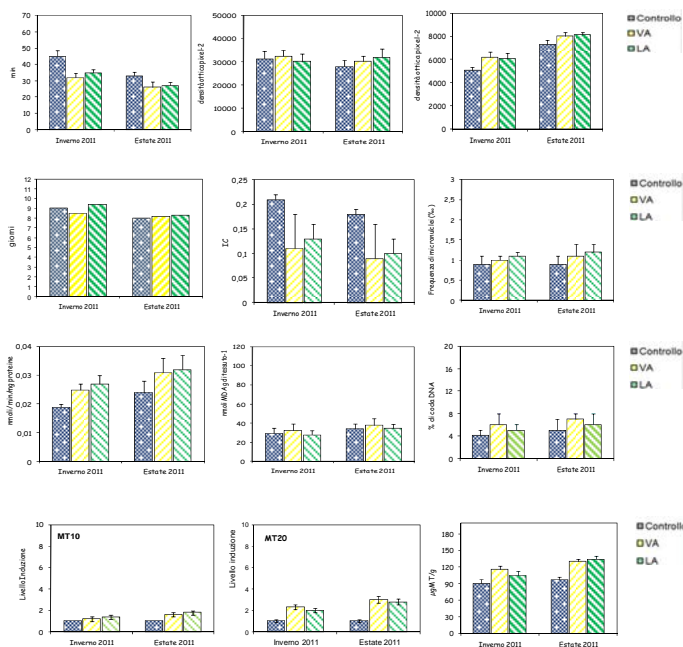


Fig. 1 – Risultati applicazione biomarkers su mitili prelevati presso la piattaforma.  $P < 0,05$

I risultati evidenziano una distribuzione omogenea, compresa tra 8 e 9 gg, dei valori di sopravvivenza all'aria. Diversamente, la stabilità delle membrane lisosomiali varia tra  $29,0 \pm 2,5$  e  $45,0 \pm 2,5$  con differenze significative tra i siti nell'ambito delle due stagioni di indagine ( $p < 0,05$ ). In modo analogo l'accumulo di lipofuscina ha evidenziato incrementi significativi in entrambe i siti ed in entrambi le campagne di studio ( $p < 0,05$ ). I livelli di lipidi neutri come i valori del test della cometa (tail: 3-6%) e delle frequenze di micronuclei (MN: 1,2 - 1,3‰) sono risultati simili a quelli riscontrati nel controllo in tutto il periodo (tail: 1%; MN 1,0‰), appaiono omogeneamente distribuiti.

Al contrario, sia la sintesi di proteine metallo-chelanti ( $p < 0,05$ , metallotioneine) sia l'accumulo di metalli pesanti nei tessuti dei bivalvi esaminati tende ad evidenziare un significativo seppur modesto effetto biologico correlabile alla presenza di elementi metallici in ambiente marino. Viene evidenziata una modesta induzione del MT20 in tutti i siti della piattaforma rispetto al controllo (up-regulation). Diversamente, l'MT10 appare scarsamente stimolato in tutti i siti.

### *Indagini ultrastrutturali*

Lo screening combinato ottica convenzionale associata al SEM ha consentito di evidenziare l'occorrenza di anomalie tissutali solo in una frazione relativamente modesta dei campioni prelevati vicino o lontano dall'anodo della piattaforma ma, tuttavia, il fatto che i campioni di controllo siano risultati pressoché privi alterazioni rende il dato di per se significativo (Tab. 2).

*Tab. 2 - Dati morfologici relativi alle alterazioni tissutali cumulative osservate mediante microscopia ottica convenzionale e SEM su sezioni di ghiandola digestiva e di gonade.*

<b>Tutti gli organi</b>	<b>Assenza di alterazioni %</b>	<b>Lievi alterazioni %</b>	<b>Gravi alterazioni %</b>
Controllo, C	93,75	6,25	0
Vicino Anodo, VA	72,7	27,3	0
Lontano Anodo, LA	85,0	15,0	0

Nel dettaglio, le alterazioni morfologiche osservate in esemplari raccolti sia lontano che vicino all'anodo sacrificale sono risultate di entità lieve, nella misura in cui la essitura complessiva dell'organo non è apparsa seriamente danneggiata e tuttavia le indagini SEM ed ottiche hanno evidenziato localmente, ovvero limitatamente a specifiche aree del tessuto, l'esistenza di un certo grado di destrutturazione o di lieve disorganizzazione della rete dei dotti. Nella tabella che segue viene riportata una statistica delle distribuzioni delle anomalie morfologiche osservate in funzione del sito di raccolta. I dati riportati si riferiscono alla valutazione cumulata delle sezioni di epatopancreas e gonadi dei mitili. La microscopia a forza atomica è stata utilizzata soprattutto come tecnica per approfondire l'investigazione su sezioni di particolare interesse. Ciò è dettato dal fatto che le misure AFM sono laboriose e limitate a poche decine di micron dell'area del campione (quindi intrinsecamente inadatte a fornire una visione d'assieme). Nella situazione specifica dei risultati della presente indagine la rilevanza dei dati ottenuti al SEM rende particolarmente interessante il raffinamento AFM. Nel complesso le analisi effettuate sulle sezioni ultrasottili non hanno, tuttavia, evidenziato la presenza di nanoparticelle di natura esogena neanche qualora siano stati analizzati gli organi risultati positivi alle analisi SEM. Questo dato suggerisce che il fenomeno di incorporamento del materiale esogeno sia estremamente locale: non ha ad oggetto l'intero tessuto e non ne diffonde gli effetti a zone limitrofe a quelle direttamente interessate.



Tabella 3 – Risultati analisi qualità ecologica

Stazione	Distanza dalla piattaforma (m)	Analisi complessiva estate 2009 – Inverno 2009			Biological Status
		W	AMBI	BENTIX	
		Disturbance Classification	Disturbance Classification	Disturbance Classification	
A1	250	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
A2	120	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
A3	60	Moderatamente disturbato	Indisturbato	Moderatamente disturbato	Buono
A4	30	Indisturbato	Leggermente disturbato	Moderatamente disturbato	Buono
AM NW	0	Moderatamente disturbato	Moderatamente disturbato	Leggermente disturbato	Moderato
AM SE	0	Moderatamente disturbato	Altamente disturbato	Altamente disturbato	Scarso
A5	30	Indisturbato	Leggermente disturbato	Moderatamente disturbato	Buono
A6	60	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
A7	120	Indisturbato	Indisturbato	Leggermente disturbato	Buono
A8	250	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
B1	250	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
B2	120	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
B3	60	Indisturbato	Indisturbato	Moderatamente disturbato	Buono
B4	30	Indisturbato	Indisturbato	Moderatamente disturbato	Buono
AM NE	0	Moderatamente disturbato	Leggermente disturbato	Indisturbato	Buono
AM SW	0	Indisturbato	Leggermente disturbato	Moderatamente disturbato	Buono
B5	30	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
B6	60	Indisturbato	Indisturbato	Moderatamente disturbato	Buono
B7	120	Indisturbato	Indisturbato	Moderatamente disturbato	Buono
B8	250	Indisturbato	Indisturbato	Moderatamente disturbato	Buono
K1	2000	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono
K2	2000	Indisturbato	Indisturbato	Leggermente disturbato	Buono
K3	2000	Indisturbato	Indisturbato	Leggermente disturbato	Buono
K4	2000	Indisturbato	Leggermente disturbato	Leggermente disturbato	Buono

## *Indici sulla comunità macrobentonica*

In Tab. 3 è riportato lo stato ecologico relativo alle diverse stazioni derivato dalla stima dei tre indici e dalla loro successiva integrazione. L'indice W di Clarke indica complessivamente la presenza di un ambiente imperturbato nell'intero periodo d'indagine eccetto in corrispondenza di A3 e dei siti in prossimità della piattaforma. L'indice AMBI tende ad evidenziare una risposta analoga a quella riportata dal precedente indice con un modesto livello di stress nei siti più vicini alla struttura. L'indice BENTIX si dimostra nel complesso più severo nei siti A3, A4, B3, B4, B5 – B8 e presso la piattaforma. Complessivamente, nel corso monitoraggi condotti durante il periodo di studio si rileva uno stato ecologico buono in tutti i siti ad eccezione di alcune aree di indagine nei pressi della piattaforma (AM SE e AM NW) dove l'integrazione dei dati ha evidenziato una qualità ecologica più modesta.

## *Discussione*

I risultati ottenuti nel corso delle diverse indagini adottate denotano uno scarso impatto associato alla presenza della piattaforma. Ciò emerge sia dai risultati delle analisi chimiche sui sedimenti come dalle indagini sulle alterazioni indotte sulla comunità bentonica, dalla stima dell'ecotossicità associata ai sedimenti esaminati e alle modeste alterazioni evidenziate a livello subletale e associate a scarsi livelli di accumulo dei inquinanti presenti nei tessuti dei bivalvi analizzati. In particolare, i sedimenti prelevati nel corso dell'intero monitoraggio non hanno indotto significativi aumenti di mortalità in specie test quali *C. orientale* e *H. diversicolor* tipicamente viventi a stretto contatto con il sedimento. L'indicazione circa la scarsa tossicità di questa matrice viene ulteriormente fornita anche dalla scarsa inibizione alla bioluminescenza osservata nel corso dei test con *V. fischeri*. I risultati sono coerenti con le indagini eseguite sulla comunità bentonica che riportano nel complesso un buon livello di qualità ecologica in tutti i siti investigati ad esclusione di un'area circoscritta limitata ai siti più vicini alla struttura ove la diminuzione della qualità ecologica potrebbe essere legata alle attività di installazione che per loro natura tendono a rimescolare il sedimento determinando una drastica diminuzione delle specie presenti in termini di presenza e di abbondanza relativa. Tale condizione tende nel tempo ad evolvere verso buoni livelli di qualità ecologica. L'applicazione della batteria di biomarkers evidenzia una scarsa sindrome di stress negli organismi prelevati presso la piattaforma. I risultati dimostrano la mancanza di alterazioni a livello metabolico, come sottolineato dalla distribuzione omogenea dei risultati della sopravvivenza all'aria. Diversamente, i test più sensibili condotti per esaminare cambiamenti a livello cellulare e subcellulare negli organismi sentinella dimostrano la diminuzione di alcuni parametri tra cui la stabilità delle membrane lisosomiali (indice specifico di stress) e dell'accumulo di lipofuscine (presenza di stress ossidativo). Scarso appare il rischio genotossico con valori del test della cometa e delle frequenze di micronuclei simili a quelli riscontrati nel controllo. I livelli intracellulari di lipidi neutri appaiono omogeneamente distribuiti e tendono quindi ad escludere la presenza di effetto legato a molecole organiche come IPA e PCB. Al contrario, sia la sintesi di proteine metallo-chelanti sia l'accumulo di metalli pesanti nei tessuti dei bivalvi esaminati tende ad evidenziare un significativo seppur modesto effetto biologico correlabile alla presenza di elementi metallici in ambiente marino. Dai test, inoltre, emerge una significativa, seppur moderata, induzione del MT20 in tutti i siti della piattaforma rispetto al controllo (up-regulation). L'MT10, invece, appare scarsamente

stimolato in tutti i siti. L'espressione di quest'ultimo gene risulta correlata all'omeostasi di cationi tipicamente essenziali allo sviluppo e alla corretta funzionalità cellulare nel mitilo. Al contrario, il gene MT20 risulta indotto in presenza di cationi non essenziali. Infine, i risultati delle indagini microscopiche hanno evidenziato scarse alterazioni ultrastrutturali in tutti i tessuti target analizzati.

### ***Conclusioni***

I risultati del monitoraggio condotto sulla piattaforma AnnaMaria B non ha evidenziato particolari criticità ambientali. Dall'indagine chimica, ecologica ed ecotossicologica condotta sulle diverse matrici emerge una discreta qualità delle acque e dei sedimenti intorno alla piattaforma. Sia i test ecotossicologici come gli indici aspecifici di stress subletale tendono a confermare tale ipotesi. Solo i test più specifici e sensibili realizzati su bivalvi consentono di rilevare una modesta biodisponibilità di alcune specie metalliche, mentre poco significativa appare la risposta biologica associata alla presenza di molecole organiche negli ambienti investigati. Poco significativi risultano gli effetti biologici correlabili alla presenza di idrocarburi policiclici aromatici, confermati, del resto, da uno scarso bioaccumulo di IPA e IA. Nel complesso i risultati dimostrano che l'azione di disturbo generata dalle fasi di installazione della struttura tende a diminuire nel tempo e senza essere aggravata da effetti correlabili alle successive fasi di funzionamento della piattaforma.

### ***Bibliografia***

- ASTM [2007] Standard guide for conducting sediment toxicity tests with polychaetous annelids. ASTM designation: E 1611-00 [reapproved 2007].
- Azur Environmental [1994] Microtox® Acute toxicity Solid-Phase Test Procedure: 20pp.
- Borja A., Franco J., Pérez V. [2000] A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environment, *Mar. Poll. Bull.* 40 (12): 1100-1114.
- Clarke K.R., R.M. Warwick [1994] Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Natural Environment Research Council, 140 [2]. 144 pp.
- Dondero F., A. Dagnino, H. Jonsson, F. Capri, L. Gastaldi, A. Viarengo [2006] Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. *Aquatic Toxicology*, 78 [1]; 13-24.
- EPA [1993] Guidance Manual Bedded Sediment Bioaccumulation Tests. EPA/600/R-93/183.
- EPA [2000] Method 6010C - Inductively coupled Plasma emission spectrometry.
- EPA [2007] Method 3545A - Pressurized fluid extraction (PFE)
- EPA [2007] Method 3620C Fluorisil Cleanup. Rev. 3
- EPA [1986] Method 8310 Polynuclear aromatic hydrocarbons. Rev. 0
- ISO 16712 [2005] Water quality - Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods.
- Girasole M., Dinarelli S., Boumis G. [2012] Structural, morphological and nanomechanical characterisation of intermediate states in the ageing of erythrocytes, *J Mol Recognit.* 25 (5): 285-291.
- Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Longo G., Pompeo G., Cotesta S., Congiu-Castellano A. [2007] Different Membrane Modifications Revealed by Atomic Force/Lateral Force Microscopy After Doping of Human Pancreatic Cells With Cd, Zn or Pb, *Micr. Res. Tech.* 70: 912-917.

May R.M. (1979) Patterns of Species Abundance and Diversity. Pp. 81-120, in Cody M.L. and Diamond J.M. (Eds). *Ecology and Evolution of Communities*, 4.

Moore M.N. (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscs to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series*, 46, 81-89.

Pielou E.C. (1974) *Population and Community Ecology: Principles and Methods*. Gordon and Breach Sci. Pbs., New York. 424 pp.

Teixeira H., F. Salas, M.A. Pardal, J.C. Marques (2007) Applicability of ecological evaluation tools in estuarine ecosystem: a case of the lower Mondego estuary (Portugal). *Hydrobiologia*, 587: 101-112.

Viarengo A., E. Ponzano, F. Dondero, R. Fabbri (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organism: an application to mediterranean and antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 44, 69-84.

Zenetos A., N. Bellou, F. Abousamra (2004) The use of BENTIX in Assessing Ecological Quality of coastal waters across the Mediterranean. Proceedings of an int. workshop on the promotion and use of benthic tools for assessing the health of coastal marine ecosystems. Intergovernmental Oceanographic Commission. Report n. 195: 19-22.

# APPLICAZIONE DI INNOVATIVI SAGGI ECOTOSSICOLOGICI PER L'ACCERTAMENTO DELLA SICUREZZA TOSSICOLOGICA NELL'AMBITO DEL RIUSO IRRIGUO DELLE ACQUE REFLUE

di R. Caricato, M.G. Lionetto, E. Erroi, T. Schettino

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali dell'Università del Salento, Lecce, Italy, roberto.caricato@unisalento.it

---

**Abstract** - In tutto il mondo il riutilizzo a fini irrigui delle acque reflue è in continuo aumento a causa della crescente scarsità di risorse idriche e della necessità di garantire la tutela dell'ambiente (riduzione dell'emungimento non controllato delle acque di falda e dell'inquinamento dei corpi idrici recettori dovuto allo sversamento dei reflui). Tuttavia, in Italia, anche in regioni come la Puglia dove il recente Piano di Tutela delle Acque e gli attuali indirizzi politici favoriscono il riuso, la sua reale implementazione sconta difficoltà e ritardi. Nell'ottica di poter contribuire a superare i suddetti ostacoli, risulta auspicabile disporre di strumenti che consentano di verificare l'efficacia delle procedure di depurazione ai fini del riuso irriguo mediante test rapidi, semplici e a basso costo.

Scopo del presente lavoro è stato lo studio dell'efficacia di depurazione ai fini del riuso irriguo di acque reflue trattate con diversi impianti di depurazione. In particolare, l'accertamento della sicurezza tossicologica nell'ambito del riuso irriguo delle acque reflue è stato perseguito mediante l'applicazione di un bioassay innovativo in vitro, recentemente brevettato dal gruppo diretto dal prof. Schettino presso l'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813) e che si basa sull'inibizione dell'attività dell'enzima anidraasi carbonica. Inoltre, i risultati ottenuti con il test dell'anidraasi carbonica sono stati messi a confronto con test ecotossicologici già standardizzati quali il test con *Vibrio fischeri* (Microtox®) ed il test con *Daphnia magna*.

In base ai risultati ottenuti è possibile affermare che l'utilizzo di innovativi saggi ecotossicologici in vitro come il test con anidraasi carbonica per l'accertamento della sicurezza tossicologica nell'ambito del riuso irriguo delle acque reflue, grazie ai suoi principali requisiti quali semplicità, rapidità e basso costo, rappresenta un valido supporto nell'ambito della verifica dell'efficacia delle procedure di depurazione ai fini del riuso irriguo.

Parole chiave: acque reflue, test ecotossicologici, anidraasi carbonica, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*.

## Introduzione

In tutto il mondo il riutilizzo a fini irrigui delle acque reflue è in continuo aumento a causa della crescente scarsità di risorse idriche e della necessità di garantire la tutela dell'ambiente (riduzione dell'emungimento non controllato delle acque di falda e dell'inquinamento dei corpi idrici recettori dovuto allo sversamento dei reflui). In Italia, tuttavia, tale pratica non è ancora inserita stabilmente nelle politiche gestionali delle risorse idriche. Anche in Regioni come la Puglia dove il recente Piano di Tutela delle Acque e gli attuali indirizzi politici favoriscono il riuso, la sua reale implementazione

sconta difficoltà e ritardi. A tal proposito, si pensi, ad esempio, agli elevati costi di depurazione conseguenza delle severe normative vigenti in materia che, senza tener conto delle finalità del riuso (tipo di coltura, tecnica agronomica adottata, ecc.), impongono limiti qualitativi talmente restrittivi (L. 185/03) da rendere necessaria l'adozione di processi di affinamento costosi. Infatti, il ricorso a strategie gestionali e tecnologie di depurazione convenzionali, partono dal presupposto di dover scaricare le acque depurate nei corpi idrici ed i cui limiti di qualità siano in linea con questo obiettivo. Al contrario, il trattamento delle acque a fini irrigui dovrebbe essere considerato un processo produttivo la cui materia prima è costituita dalle acque di scarico e il cui prodotto finale è una risorsa idrica alternativa a quelle convenzionali. In quest'ottica, la progettazione degli impianti dovrebbe essere rivista, modificata e semplificata considerato che la rimozione di alcuni inquinanti (es. sostanza organica e nutrienti) potrebbe addirittura non essere necessaria. Un tale approccio consentirebbe una sensibile riduzione dei costi. Non ultima in ordine di importanza, la negativa percezione da parte di agricoltori, mass media e presidi autorizzativi, relativa ai rischi associati all'impiego in agricoltura dei reflui depurati.

Al fine di contribuire a superare i suddetti ostacoli, risulta auspicabile verificare l'efficacia delle procedure di depurazione ai fini del riuso irriguo, mediante test rapidi e a basso costo che consentano la valutazione in campo dell'eco-tossicità di suoli ed acque. I saggi ecotossicologici hanno la finalità di rilevare in condizioni standardizzate di laboratorio alterazioni indotte da contaminanti chimici sugli organismi viventi, ai vari livelli di organizzazione biologica, dalla risposta sub-cellulare al livello di organismo (Tarazona et al., 1995). L'applicazione dei saggi biologici offre numerosi vantaggi: 1) possibilità di valutare l'effetto globale, in termini di tossicità, dell'insieme di contaminanti chimici presenti in matrici ambientali, tenendo conto, quindi, di eventuali effetti additivi o sinergici; 2) possibilità di valutare l'effetto di sostanze per le quali non esistono limiti di emissione o concentrazioni massime ammissibili; 3) possibilità di valutare in modo diretto l'effetto sugli organismi viventi di svariati contaminanti chimici; 4) possibilità di valutare diversi end-point d'effetto, compresi effetti acuti e cronici; 5) possibilità di operare in condizioni controllate, standardizzate e, quindi ripetibili; 6) rapidità e facilità di esecuzione; 7) possibilità di individuare la presenza di contaminanti chimici biodisponibili. La biodisponibilità dei contaminanti chimici rappresenta, infatti, un aspetto cruciale della contaminazione chimica, in quanto essa è direttamente responsabile del rischio chimico ambientale. I contaminanti chimici biodisponibili rappresentano la porzione della concentrazione totale di contaminanti chimici presenti nell'ambiente che è di diretta rilevanza ecotossicologica, in quanto in grado di interagire direttamente con gli organismi producendo alterazioni dei processi biochimici e fisiologici.

Scopo del presente lavoro è stato lo studio dell'efficacia di depurazione ai fini del riuso irriguo di acque reflue trattate con diversi impianti di depurazione. In particolare, l'accertamento della sicurezza tossicologica nell'ambito del riuso irriguo delle acque reflue è stato perseguito mediante l'applicazione di un *bioassay* innovativo in vitro, recentemente brevettato dal gruppo diretto dal prof. Schettino presso l'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813) e che si basa sull'inibizione dell'attività dell'enzima anidrasa carbonica. Inoltre, i risultati ottenuti con il test dell'anidrasa carbonica sono stati messi a confronto con test ecotossicologici già standardizzati quali il test con *Vibrio fischeri* (Microtox) ed il test con *Daphnia magna*.

Per quanto riguarda il test con anidrasa carbonica, si tratta di un metodo innovativo per la misura del grado di tossicità di matrici acquose ambientali in modo rapido, semplice, sensibile e a basso costo e senza l'utilizzo di organismi vivi. L'idea innovativa

alla base del presente metodo consiste nella misura del grado di inibizione dell'enzima anidraasi carbonica come strumento di rivelazione della tossicità di matrici acquose ambientali, quali acque reflue. L'entità della inibizione enzimatica risulta essere proporzionale al grado di tossicità del campione, che, a sua volta, scaturisce dall'insieme degli effetti additivi e/o sinergici che più sostanze chimiche di varia natura presenti possono esercitare sul "sensore biologico". Tale metodo è, pertanto, facilmente applicabile ad operazioni di screening di tossicità ambientale. Rispetto ai tradizionali test di tossicità basati sull'utilizzo di organismi vivi, l'applicazione del bioassay innovativo proposto offre numerosi elementi di novità quali: la possibilità di ottenere informazioni di tossicità da matrici ambientali direttamente riferibili a potenziali effetti sulla salute umana; infatti, tale bioassay è basato sull'utilizzo di una isoforma di anidraasi carbonica bovina che presenta un elevato grado di omologia con l'isoforma umana; la possibilità di superare un limite dei saggi ecotossicologici basati sull'utilizzo di organismi vivi rappresentato dalla eventuale interferenza nella misura di tossicità di sostanze allelopatiche o organismi patogeni per la specie test presenti nella matrice ambientale da testare; la possibilità di ottenere risultati perfettamente attendibili, corrispondenti a quelli ottenuti con i test tradizionali, ma in tempi e con costi ridotti. Tale metodo, inoltre risponde in maniera innovativa alla continua richiesta di metodologie di screening affidabili, sensibili, di facile impiego e di basso costo per applicazioni di routine nel monitoraggio ambientale; soddisfa le recenti richieste della Comunità Europea che scoraggia per motivi etici, l'applicazione di test di tossicità basati sull'utilizzo di organismi vivi.

### **Materiali e metodi**

Nell'ambito del presente lavoro sono stati analizzati 11 campioni di acque reflue depurate in diversi impianti situati in Puglia (presso i comuni di Noci (BA), Acquaviva (BA), Mola di Bari (BA), Ostuni (BR), Fasano (BR), e Trinitapoli (FG)) a cura di diverse imprese (AQUASOIL S.r.l., BIOTEC S.r.l., ECOIMPIANTI SUD S.r.l., ELETTROMECCANICA CMC, FIORELISI S.r.l., INTESIS S.r.l., SERECO S.r.l.) e con diverse procedure (trattamenti convenzionale, secondario, lagunaggio, affinamento). Su ciascun campione è stato effettuato sia il test innovativo con anidraasi carbonica, sia i test già standardizzati quali il test con *Vibrio fischeri* e il test con *Daphnia magna*. Il bioassay basato sull'utilizzo di anidraasi carbonica si basa su un metodo elettrometrico di dosaggio enzimatico. Per quanto riguarda il test con *Daphnia magna* si è scelto di utilizzare la metodica APAT-IRSA/CNR 8020 Man.29/2003, aderente alle linee guida previste dal D.Lgs. 152/99. L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna*. Il test acuto con *Daphnia magna* consiste nell'esporre neonati di meno di 24h al campione di acqua da analizzare; dopo un periodo di tempo prestabilito (24h o 48h) si osserva la percentuale di individui sopravvissuti. I risultati possono essere espressi o come percentuale di individui morti/immobilizzati o come valore di EC50, cioè come percentuale di diluizione della matrice acquosa che determina la morte/immobilizzazione del 50% degli individui impiegati nel test.

Per quanto riguarda il test Microtox®, proposto a livello internazionale per il monitoraggio della qualità di acque e sedimenti (ASTM, 1996), l'organismo utilizzato è il batterio luminescente *Vibrio fischeri* (ceppo NRRL-B-11177, batterio marino Gram-negativo, aerobio-anaerobio facoltativo), della famiglia delle Vibrionacee. La caratteristica di questi organismi alla base del loro utilizzo nei test di tossicità è la loro bioluminescenza. *Vibrio fischeri*, infatti, può emettere luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 490 nm, purché sia presente ossigeno. Il saggio Microtox fornisce indicazioni di tossicità acuta sulla base della riduzione della bioluminescenza naturale di batteri della specie *V. fischeri* in presenza di

contaminanti. I batteri utilizzati nel test sono liofilizzati e conservati a -20°C; al momento di eseguire il saggio la coltura viene reidratata ottenendo così una sospensione di microrganismi pronta per l'uso. Questa viene esposta per 5', 15' e 30' a diverse diluizioni del campione da saggiare. La quantità di luce emessa, opportunamente corretta per la diminuzione di luce che si verifica fisiologicamente in assenza di tossicità, è proporzionale all'effetto causato nel batterio dalle eventuali sostanze tossiche presenti nel campione da testare. La lettura della bioluminescenza è stata effettuata tramite luminometro termostato a 15°C (Microtox mod. 500).

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

La sensibilità del bioassay in vitro basato sull'inibizione dell'attività di anidrasi carbonica a diversi composti chimici organici e inorganici rilevanti per la contaminazione di acque reflue è stata testata esponendo l'enzima a concentrazioni crescenti di carbaryl (pesticida carbammato), arochlor 1248 (facente parte della classe dei PCBs), e a metalli pesanti quali cadmio, rame e mercurio. L'enzima ha mostrato un elevato grado di sensibilità alle diverse classi di contaminanti con valori di EC50 compresi nell'ambito di decimi di ppm.

Il saggio con anidrasi carbonica è stato testato anche su campioni reali rappresentati da campioni di acque reflue depurate. Gli stessi campioni sono stati sottoposti anche all'analisi con Microtox e con il test acuto con *Daphnia magna*. Il test basato sull'inibizione di anidrasi carbonica ha mostrato un buon grado di concordanza con gli altri suoi test. In particolare, il nuovo bioassay in vitro ha mostrato risultati concordanti con il Microtox test nel 72% dei campioni analizzati.

### ***Conclusioni***

In base ai risultati ottenuti è possibile affermare che l'utilizzo di innovativi saggi ecotossicologici in vitro come il test con anidrasi carbonica per l'accertamento della sicurezza tossicologica nell'ambito del riuso irriguo delle acque reflue, grazie ai suoi principali requisiti quali semplicità, rapidità e basso costo, rappresenta un valido supporto nell'ambito della verifica dell'efficacia delle procedure di depurazione ai fini del riuso irriguo.

### ***Bibliografia***

- ASTM, 1996. Standard test method for assessing the microbial detoxification of chemically contaminated water and soil using a toxicity test with a luminescent marine bacterium. American Society for Testing and Materials., D5660-96.
- Brevetto n. MI2008A008813. Schettino T., Lionetto M.G., Erroi E. (2008). Metodo per la valutazione enzimatica della tossicità di matrici acquose ambientali. Brevetto con titolarità dell'Università del Salento. MI2008A00813 del 6 maggio 2008; PCT/EP2008/064703 del 30/10/2008.
- Tarazona J.V., Carballo M., Castaño A., Munoz M.J. (1995). The role of cell biology in application of toxicology to environmental sciences: biological assessment of pollution and biomarkers. In: Cell biology environmental toxicology. Cajaraville M-P (ed), University of the Basque country press service, pp15-28
- Wilbur K. M., and Anderson G. N. 8 (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. J. Biol. Chem. 176: 147-154.



# USING SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS* EMBRYOS IN MARINE POLLUTION STUDIES: GENOME-INSPIRED ASSAYS

by C. Della Torre<sup>1</sup>, L. E. Shipp<sup>2</sup>, T. Gokirmak<sup>2</sup>, J. P. Campanale<sup>2</sup>, I. Corsi<sup>1</sup> and A. Hamdour<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Ambientali Università di Siena, via Mattioli 4, 53100, Siena, Italia, dellatorre2@unisi.it

<sup>2</sup> Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, 8750 Biological Grade Road, La Jolla CA 92037

---

**Abstract** - The goal of this study was to investigate the involvement of the Multi Xenobiotic Resistant (MXR) proteins as part of the defense mechanism against pollutants in *S. purpuratus* embryos. Toxicity of Hg - evaluated as morphological defects- and of vinblastine -evaluated as swimming performance- was investigated in the presence or absence of MXR inhibitors. MXR over-expression assay was also performed. Abcbs and abccs mRNAs were synthesized in vitro from fluorescent protein tagged transporter cDNA cloned into pSC2+8. mRNAs were then microinjected into embryos and Hg and vinblastine toxicity was compared to un-injected embryos. Hg toxicity increased in the presence of MK571, resulting in a higher incidence of severely deformed embryos at 0.2 and 0.4 $\mu$ M. Both MK571 and PSC388 produced an inhibition of archenteron development at 0.2 $\mu$ M. Vinblastine toxicity was increased in the presence of cyclosporine by shifting the effective threshold from 10 $\mu$ M to 1 $\mu$ M. Preliminary results suggest a potential protective role of MXR proteins against Hg in *S. purpuratus* embryos.

Keywords: *Strongylocentrotus purpuratus*, ABC transporters, mercury, vinblastine

## Introduction

The sea urchin is a widely established model to study the toxic effects of pollutants during embryonic development (Bonaventura et al., 2011). Understanding of the cellular response to toxic chemicals in sea urchin embryos would increase the knowledge of the molecular mechanisms underlying the toxicity of contaminants and contribute to development of sensitive tools to assess and diagnose effects of pollutants. Previous studies on *Strongylocentrotus purpuratus* genome have been described more than 400 genes thought to protect against chemical stressors and collectively defined as “chemical defensible” (Goldstone et al., 2006). The Multixenobiotic Resistance Mechanism (MXR) is an integral part of this detoxification machinery (Kurelec, 1992; Smital et al., 2004). MXR activity is mediated by the expression of efflux trans-membrane proteins known as ATP-binding cassette (ABC) transporters that exploit the binding and hydrolysis of ATP to excrete numerous endogenous and exogenous substances, preventing intracellular accumulation and potential toxic effects (Leslie et al., 2005). The most toxicologically relevant ABC transporter is the P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) followed by the multidrug resistance-associated proteins (MRP1–5, ABCC1–5) and the breast cancer resistance protein

(BCRP, ABCG2) [Litman et al., 2001]. These transport proteins regulate the disposal of substances from the cell in the form of original molecules (phase 0 entry) and metabolites (phase III exit).

The expression of 20 ABC transporters belonging to ABCB, ABCC and ABCG families has been characterized in *S. purpuratus* embryos from unfertilized eggs to early prism with different functions, as pollutants efflux, cell signalling and differentiation [Shipp and Hamdoun, 2012]. Regardless their relevance in the cellular defence mechanism, few studies have been performed to characterize the function of these proteins against pollutants in sea urchin embryos. The goal of this study was thus to develop novel tools to investigate the response of MXR proteins against toxic compounds in *S. purpuratus* hatched embryos. The vinca-alkaloid anticancer drug vinblastine and the toxic metal Hg were tested based on the reported protective role of ABC transporters against both chemicals at early developmental stages [Hamdoun et al., 2004; Bosniak et al., 2009].

### **Methods**

*Strongylocentrotus purpuratus* were collected off the coast of San Diego, California, kept in 12°C running seawater, and fed with kelp. Gametes were obtained through injection of 0.5 M KCl. Eggs were collected in raw seawater, passed through a 120- $\mu$ m nitex filter, and washed twice in filtered seawater (FSW). Eggs in FSW were fertilized with 5  $\mu$ l sperm (diluted 1/3000 in FSW). Fertilization was visually confirmed, and only batches with >95% fertilization were used for experiments. Embryos were washed twice in FSW to remove excess sperm, and the culture was grown at a concentration of 200 embryos/ml FSW at 12°C.

Hatched embryos swimming in the water column were collected 27 hpf and put in 6 wells dishes in 2 ml FSW. Embryos were exposed to increasing concentrations of vinblastine and HgCl<sub>2</sub> (0-1 $\mu$ M) and toxicity endpoints measured after 1 h (28 hpf) or 24 h (48 hpf). Alterations of the swimming performance were observed as toxicity endpoints for vinblastine, for Hg morphological defects were scored. Both compounds were tested singly and combined with known inhibitors of P-gp and MRPs activities as cyclosporine, PSC833 and MK571.

Capped mRNA was made from fluorescent protein tagged transporter cDNA cloned into pSC2+8 [Hamdoun 2009]. *Abcb1a*, *abcb4a*, *abcc1*, *abcc5a*, *abcc9a* and *abcg2a* mRNA was injected into fertilized eggs. At 27 hpf un-injected and injected embryos were collected and placed into 48 wells plate in 2 ml of FSW. After 2 h embryos were exposed to vinblastine and HgCl<sub>2</sub> and toxic effects on embryo development were measured after 8 h for vinblastine and after 24 h for HgCl<sub>2</sub>. Embryos were visualized on a Zeiss LSM-700 laser scanning confocal microscope using a Zeiss plan apochromat 20x air objective (numerical aperture, 0.8; Zeiss, Thornwood, NY). All images were captured using the Zen software suite and processed with ImageJ [NIH, Bethesda, MD].

### **Results**

Vinblastine exposure affected the swimming behaviour of hatched embryos. Already after 1 h of exposure they started to spin counterclockwise around the animal-vegetal axis. Spinning effect was visible starting from 1 $\mu$ M. Co-exposure with the MXR inhibitor cyclosporine increased vinblastine toxicity shifting the EC<sub>50</sub> from 6.21  $\mu$ M to 0.95  $\mu$ M. Regarding Hg, the morphological defects observed were a general developmental delay and slight asymmetry at concentrations from 0.01 to 0.1  $\mu$ M, a reduction of the archenteron development at 0.2  $\mu$ M and severe alterations until lysis at concentrations of 0.4 to 0.6  $\mu$ M. The co-exposure with non-toxic concentrations of MK571 (2.5  $\mu$ M) and PSC833 (3  $\mu$ M) determined an increase in the severity of the

alterations at 0.2  $\mu\text{M}$  and inhibition of archenteron development at 0.4  $\mu\text{M}$ . Preliminary results suggest that ABC protein overexpression might protect against vinblastine and Hg.

### ***Discussion***

The temporal expression profile of ABC genes in *S. purpuratus* embryos showed a significant increase in the expression after hatching (Shipp and Hamdoun, 2012). Nevertheless so far the response of MXR against contaminants has been investigated only at early developmental stages. Moreover a direct involvement of a specific transporter in relation to different compounds cannot be established. Our attempt was thus to develop a sensitive assay to investigate the role of specific ABC transporters in reducing the toxic effects of environmental pollutants in embryos after hatching.

Comparing the effects of different compounds on swimming performance we confirmed that the spinning effect is a feature of tubulin destabilizers as vinblastine (Semenova et al., 2006). Our observations indicate that for these compounds the swimming assay could be easily applied as toxicity endpoint in embryos after hatching. The co-exposure experiment confirmed vinblastine as substrate of P-gp in *S. purpuratus* embryos as reported for humans and fish (Shirasaka et al., 2006; Zaja et al., 2008).

Results confirmed the toxicity of Hg to hatched embryos at concentrations comparable to that observed for early developmental stages (Bosnjak et al., 2009). Hg exposure tends to produce binary effects, with only minor alterations up to the concentration of 0.2 / 0.4  $\mu\text{M}$  and severe morphological abnormalities exceeded this threshold concentration. The co-exposure experiment allowed to assess the involvement of ABC transporters in the protective response against Hg. This response involves both the P-gp, which inhibitor is PSC833, and MRPs, whose referred inhibitor is MK571.

Preliminary results indicate that ABC proteins overexpression represents a promising ecotoxicological assay in sea urchin embryos that can provide direct evidence for protective activity of transporters against specific pollutants. Further confirmation and adaptation of the analysis -such as selection of sensitive toxicity endpoints and proper test concentrations- are thus strongly recommended also in other species and for different proteins involved in cell detoxification system.

### ***Acknowledgements***

This work has been supported by the 2012 “Luigi and Francesca Brusarosco award” of the Italian Ecology Society.

### ***References***

- Bonaventura R., F. Zito, C. Costa, S. Giarrusso, F. Celi, V. Matranga (2011) Stress response gene activation protects sea urchin embryos exposed to X-rays. *Cell Stress Chaperones* 16: 681-687.
- Bosnjak I, K.R. Uhlinger, W. Heim, T. Smital, J. Franekic-Colic, K. Cole, D. Epel, A. Hamdoun, (2009) Multidrug Efflux Transporters Limit Accumulation of Inorganic, but Not Organic, Mercury in Sea Urchin Embryos. *Environmental Science and Technology* 43: 8374-8380.
- Foltz K.R., N.L. Adams, L.L. Runft (2004) Echinoderm eggs and embryos: procurement and culture. *Methods Cell Biology* 74: 39–74.
- Goldstone J.V., A. Hamdoun, B.J. Cole, M. Howard-Ashby, D.W. Nebert, M. Scally, M. Dean, D. Epel , M.E. Hahn, J.J. Stegeman (2006) The chemical defensible:

environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Developmental Biology* 300: 366-384.

Hamdoun, A.M., G.N. Cherr, T.A. Roepke, D. Epel, (2004) Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Developmental Biology* 276: 452-462.

Hamdoun A (2009) Reduced intracellular accumulation of calcein by overexpression of fluorescent protein fusions of the multidrug transporter Sp-ABCB1a, in sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) embryos. *MDIBL Bulletin* 48: 59-62.

Kurelec B. (1992) The multixenobiotic resistance mechanisms in aquatic organisms. *Critical Reviews on Toxicology* 22: 23-43.

Leslie E.M., R.G. Deeley, S.P. Cole (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204: 216-237.

Litman T., T.E. Druley, W.D. Stein, S.E. Bates (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 931-959.

Semenova M.N., A. Kiselyov, V.V. Semenov (2007) Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators. *Biotechniques* 40: 765-774.

Shipp L., A. Hamdoun (2012) ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Expression and Localization in Sea Urchin Development. *Developmental Dynamics* vol. 241: 1111-1124.

Shirasaka Y., M. Kawasaki, T. Sakane, H. Omatsu, Y. Moriya, T. Nakamura, T. Sakaeda, K. Okumura, P. Langguth, S. Yamashita (2006) Induction of human P-glycoprotein in Caco-2 cells: development of a highly sensitive assay system for P-glycoprotein-mediated drug transport. *Drug Metabolism and Pharmacokinetic* 21: 414-423.

Smital T., T. Luckenbach, R. Sauerborn, A. Hamdoun, R. Vega, D. Epel (2004) Emerging contaminants - PPCPs, pesticides and microbial degradation products as inhibitors of the multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research* 552: 101-117.

Zaja R., D. Caminada, J. Loncar, K. Fent, T. Smital (2008) Development and characterization of P-glycoprotein 1 [Pgp1, ABCB1]-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 227: 207-218.

# APPLICATION OF PLHC-1 AS IN VITRO BIOASSAY FOR AH RECEPTOR ACTIVE COMPOUNDS IN ENVIRONMENTAL MATRICES

by Anzhela Malysheva, Camilla Della Torre, Ilaria Corsi, Michela Mariottini, Silvano Focardi

Dipartimento di Scienze Ambientali Università di Siena, via Mattioli 4, 53100, Siena, Italia, malysheva@student.unisi.it

---

**Abstract** - In the present study both analytical chemistry and bimolecular assays were used to evaluate the level of contamination of soil samples by dioxin-like compounds. The analyzed soils were sampled from two different sites indicated as A and B located close to an industrial area near a municipal waste incinerator and two different fractions as not-purified and purified (containing PCDD/Fs) were obtained. The concentration of single PCDD/Fs and PCB congeners, measured by GC/MS and converted into Chem-TEQ (Toxic Equivalent). The Chem-TQ value was compared with the correspondent Bio-TEQ value obtained from induction of EROD activity in the *Poeciliopsis lucida* fish cell line (PLHC-1) exposed to both fractions. The Chem-TEQ values indicate an higher toxicity of sample B than A, while from the cytotoxicity assay on PLHC-1 sample A seems to be more toxic. Similar results obtained from cyp1a gene expression and EROD assays indicate a higher dioxin-like activity of the sample A than B. The response of the biological system seemed to be up-regulated due to exposure to not-purified fractions of both samples, suggesting the presence of other substances with dioxin-like activity not measured by chemical analysis. Such a result shows the importance of the in vitro bioassay as a complementary tool for environmental monitoring programmes.

Keywords: CYP1A, dioxins, PLHC-1, biomonitoring

## **Introduction**

The objective of the present study is to improve the current knowledge concerning the application of fish cell lines as alternative in vitro model for the toxicological screening of environmental samples.

Besides well established in vitro mammalian model, the application of fish cell line in ecotoxicology represents a useful tool to assess the toxic potential of environmental matrices for non target species (Fent, 2001).

Most of toxic effects upon exposure to dioxin-like chemicals are mediated by the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and CYP1A induction. Thus CYP1A induction is regarded as one of the most sensitive endpoint to assess the presence and toxicity of priority pollutants (Fent, 2001). The *Poeciliopsis lucida* hepatoma cell line (PLHC-1) has been commonly used in ecotoxicology to investigate toxicological pathways of chemicals and environmental samples (Fent, 2001; Traven et al., 2008; Smital et al., 2011). PLHC-1 expresses the gene for the aryl hydrocarbon receptor AhR (Hahn, 1998) and showed high capability to metabolize xenobiotics.

The present study investigates CYP1A response in terms of *cyp1a* gene transcription and EROD activity in PLHC-1 exposed to soils extracts. CYP1A induction potential is compared to concentration of priority pollutants determined by chemical analysis to evaluate the sensitivity of both endpoints and their potential application in environmental monitoring.

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

#### *Sample preparation and chemical analysis*

Soil samples were collected in two sites (A, B) close to an industrial incinerator. Samples were extracted in toluene and a first fraction (Not Purified) was collected. Another fraction (Purified) was subjected to clean-up procedure through Power-Prep™ using silica gel, alumina and activated carbon column. Both fraction were collected and dissolved in DMSO after concentration under N flow prior to biological assay. GC/MS analysis was performed to detect mono-ortho and di-ortho PCBs (NP) and non-ortho PCBs and PCDDs/PCDFs (P). Chem-TEQs were the calculated based on WHO 2006 (Van den Berg, 2006).

#### *Cell treatments and test*

PLHC-1 cells (ATCC; LGC Promochem, Teddington UK) were grown in 75 cm<sup>2</sup> plastic flasks at 30°C in DMEM supplemented with 5% FCS. Cell viability was measured by neutral red assay in cells exposed for 24 h to a range of dilution of tested extracts (0-100 mg/ml) dissolved in DMSO (max 1%). Modulation of *cyp1a* gene transcription was measured in cells exposed for 24 h to non cytotoxic concentrations of a model CYP1A inducer as TCDD [1,10,50 pM] and to two dilution of tested extracts [1,10 mg/ml for P fraction and 0.5, 5 mg/ml for NP fraction]. Real-time PCR was used to evaluate *cyp1a* gene expression using *r18S* as housekeeping gene. Realtime *cyp1a* expression for each treatment was compared to control using Rest 2008 V2.0.7.

To measure EROD activity cells were exposed for 24 h to a range of dilution of TCDD (0-10 nM) and to tested extracts (0-50 mg/ml for P fraction and 0-10 mg/ml for NP fraction) dissolved in DMSO (max 1%). EROD TEQ values were calculated based on the following equation  $EROD\ TEQ\ pg/g = EC50\ TCDD\ pg/ml / EC50\ sample\ mg/ml * 1,000\ g/ml$ .

### ***3. Results and discussion***

#### *Chemical analysis*

Significant levels of PCDDs/PCDFs have been detected in sample B (150 pg/g d.w.), while only low level of OCDD was detected in sample A (11 pg/g d.w.). Any trace of non-ortho PCBs were determined in both samples. On the contrary PCBs were one order of magnitude higher in sample A than B (12,46 ng/g and 1,91 ng/g respectively). Based on these results Chem-TEQ values resulted 0.081 pg/g for sample A and 20.32 pg/g for sample B.

#### *Cell bioassays*

Any cytotoxic effect has been observed after 24 h of exposure to purified fraction of both samples, while for non purified samples showed cytotoxic effects with LC50 of 10.34 mg/ml for sample A and 27.73 mg/ml for sample B.

TCDD determined a dose-dependent up-regulation of *cyp1a* gene transcription 15-folds respect to controls at 10pM and 109-folds respect to control at 50pM, thus

confirming the sensitivity of the adopted model. A significant up-regulation of *cyp1a* was observed only at the highest concentration for the purified fraction of both samples A and B (2.1 and 1.8 folds respectively). The non purified 54 fraction of both samples determined a significant dose dependent up-regulation of *cyp1a* from 2.4 to 15-folds up-regulation for sample A and from 2.1 to 13-folds for sample B. Concerning EROD activity the EC50 and EC10 measured for TCDD was 17.96 pM and 2.00 pM, respectively (Tab. 1). A similar tend of EROD induction has been observed for A np and B np, while no modulation of EROD by A p was observed and only a slight induction was observed for B p (reaching a maximum of 7.4 pmol/min/mg prot at 50 mg/ml). A higher EROD TEQ values was calculated for A np compared to B np.

*Table 1: EC50, EC10 and EROD TEQ calculated for TCDD and non purified fraction of soil samples*

	EC50	EC10	EROD TEQ pg/g
TCDD	5.78 pg/ml	0.64 pg/ml	
Anp	2.90 mg/ml	0.32 mg/ml	1990
Bnp	5.45 mg/ml	0.61 mg/ml	1060

### **Conclusions**

Overall results confirm PLHC-1 cells as highly sensitive model to AHR active compounds as significant effects were observed even at low levels of contaminants. Results from bioassays does not agree with Chem-TEQ values calculated based on chemical analysis suggesting that compounds other than PCDDs/PCDFs heavily contribute to CYP1A induction at both gene and activity levels and to cytotoxicity. At low contaminants concentrations EROD activity resulted more sensitive than *cyp1a* gene.

### **References**

- Fent K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol In Vitro* 15: 477–488.
- Hahn M.E. (1998). The aryl hydrocarbon receptor. A comparative perspective. *Comp Biochem Physiol C* 121: 23 – 54.
- Smital T, Terzic S, Zaja R, Senta I, Pivcevic B, Popovic M ( 2011). Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotox Environ Saf* 74:844-851.
- Traven L, Zaja R, Loncar J, Smital T, Micoviv V. (2008). CYP1A induction potential and the concentration of priority pollutants in marine sediment samples – In vitro evaluation using the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Toxicol In Vitro* 22: 1648–1656.
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M,c De Vito M,b Farland W. (2006). The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicol Sci* 93: 223-241.

# FIRST DATA ON THE USE OF NATIVE ALGAL STRAIN FROM ECOSISTEMA FILTRO TO DETECT THE EFFECT OF PHOSPHATE ON GROWTH INHIBITION

by *Veronica Malavasi, Michela Marignani, Maria Cecilia Loi*

Department of Life and Environmental Sciences  
Botany and Botanical Garden Division University of Cagliari; IT  
veronica.malavasi@unica.it; marignani@unica.it; loimc@unica.it

---

**Abstract** - The present work is a part of report on the results of a survey of the algal flora of a constructed wetland, the Ecosistema Filtro (EFS). A freshwater microalgal species was selected and assay was performed following standard guidelines, in an attempt to evaluate the role of laboratory assessments in ecological risk assessment studies. *Scenedesmus sp.* was viewed to a good option for the assay because it grew well and according to control acceptability criteria. We evaluated growth estimates by comparing manual cell counting to more automated growth estimates using absorbance endpoints. Results confirm the chances to promote an integrative hazard assessment approach, combining laboratory, in situ assays, water-quality parameter

Keywords: Ecosistema Filtro (EFS); Natural Park; green algae; bioassay; phosphate

## *Introduction*

Algae are the dominant primary producers in the aquatic food chains and impairment of this production base causes effects at higher trophic levels. Nutrients such as phosphorous (P) and nitrogen (N) are essential for the growth of algae and other plants. Aquatic life is dependent upon these photosynthetic organisms, which usually occur in low levels in surface water. Excessive concentrations of nutrients, however, can overstimulate aquatic plant and algae growth. Bacterial respiration and organic decomposition can use up dissolved oxygen, depriving fish and invertebrates of available oxygen in the water (eutrophication). Fertilizers, failing septic systems, waste water treatment plant discharges, and wastes from pets and farm animals are typical sources of excess nutrients in surface waters. The trophic state of aquatic ecosystems depends on the supply and concentration of limiting nutrients and P is generally the primary factor limiting growth in freshwater. This means that excessive amounts of phosphorous in a system can lead to an abundant supply of vegetation and cause low DO (Dissolved Oxygen). The principal external P input to the aquatic food web of pelagic ecosystems comes from assimilation of dissolved orthophosphate by algae. Wetlands are widely distributed freshwater habitats with important ecosystem functions [1]. Algal communities in wetlands are often taxonomically unique and important drivers of ecosystem function [2,3]. Because of their nutritional needs and their position at the base of aquatic foodwebs, algal indicators provide relatively unique information concerning ecosystem conditions compared with commonly used animal indicators. Algal indicators are also a cost-effective monitoring tool. Therefore, algae are being increasingly used as ecological



indicators and phyto remediation organisms polluted, urban aquatic environments [4,5]. Usually, the algal species selected as ecological indicators is chosen for its availability, reproducible growth under laboratory conditions and reliable toxicity response, even if it is known that the environmental relevance of algal assay is enhanced by using a species belonging to the phytoplankton community occurring in the natural ecosystems [6]. We present the results of a survey of the algal flora of a constructed wetland, the Ecosistema Filtro (EFS). A freshwater microalgal species was selected and assay was performed following standard guidelines, in an attempt to evaluate the role of laboratory assessments in ecological risk assessment studies. The main goals of this work are to i) test the coherence of results obtained in flasks and microplate and ii) estimate the effect of phosphate on growth stimulation in *Scenedesmus* sp. by using haemocytometer and spectrophotometer absorbance values, testing the coherence among the adopted methods.

## ***Materials and methods***

### *Study area*

The area chosen to evaluate the microalgal ecotoxicological bioassay for freshwater environments was the aquatic system of the Ecosistema Filtro (ESF). The ESF is situated in southern Sardinia on the Gulf of Quartu (Cagliari), within the Molentargius-Saline Regional Natural Park. The Park covers a wetland of international importance marked by the presence of outstanding biodiversity linked to its different freshwater and salt water environments. Besides the area is part of the Natura 2000 network, including includes a Site of Community Importance (ITB040022 – Stagno di Molentargius e territori limitrofi) and a Special Protection Area (ITB044002 – Saline di Molentargius). The Ecosistema Filtro EFS (Filtering Ecosystem) is a constructed wetland forming an integral part of the Natural Park. The structure is a Free Water Surface System (FWS) located within the Bellarosa Maggiore and covers about 37 hectares. The ESF receives wastewater from sewage treatment of the Is Arenas depurator, following a finishing treatment through a phyto-purification, and feeds the ponds of the Bellarosa Minore and Perdalonga [7].

### *Strain isolation and cultivation*

During an investigation of the floristic composition of freshwater algae in ESF we found a green alga strain in the autumn of the year 2011. The sample was taken from the surface of the water body (phytoplankton). Using micropipettes and serial dilution a single cell was isolated [8]. Under light microscope this alga was identified as belonging to the genus *Scenedesmus*, while molecular analysis for identification of the species are ongoing. After isolation, stock cultures were established under controlled laboratory conditions (25°C, photoperiod of 12:12). The algae were maintained routinely and precultured in modified WARIS-H culture medium without soil extract [9] under cool white light luminescent (80–100  $\mu\text{mol photons/ (m}^2 \text{ s)}$ ) and continuously shaken. The microalga *Scenedesmus* sp. was the species selected to perform the bioassay for two main reasons: it is a species easily available from this habitat and maintained in the laboratory under reproducible culture conditions. The microalgae is maintained in culture flask (axenic conditions) at the University of Cagliari - Department of Life Sciences and the environment – section Botany and Botanical Garden (Culture Collection of freshwater Algae from Sardinia) [10].

### *Experimental culture conditions*

In developing and evaluating a microalgal bioassay, one of the concerns was to follow, to the extent possible, the basic principles of standard algal toxicity tests, specifically

those of the standard ISO 5667-16/98 [11] and 8692/89 [12], ISO 14442/1999 [13], 8692/2004 [14] and the proposed changes in Passarelli and Sbalchiero [15]. About ISO 8692/2004, we adopted the version developed by UNI (Italian Organization for Standardization) that assumes the status of a national standard Italian (UNI EN ISO 8692/2005) [16]. The alga was grown in WARIS-H culture medium without soil extract for 16 days in 100 mL Erlenmeyer flasks and 2 mL 24 well to observe the control. Alga toxicity tests was performed in 24-well polystyrene microplates with 2 mL liquid in each well were used for these tests (Multi-Well-Plates, Nest Biotech Co., Ltd, China). A 72 h algal growth stimulation and inhibition test was carried out using  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as reference toxicant. This test was randomized and the toxicant was dosed in dilution series of five concentrations in triplicates. The number of algae cells in the control wells must increase by at least a factor of 16 (ISO 8692/1989) during the 72 h test period for the toxicity test to be acceptable. All the experiments were started by inoculating the microplate with an initial concentration of  $9,5 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>. The inoculum was obtained from a preculture which was incubated under test conditions and used when cells were exponentially growing (4 days before the start of the test). The chemical used as reference toxicant was Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Carlo Erba, Italy). The substance was soluted and diluted using bidistilled water (Carlo Erba, Italy). The dilution series of tested chemical compound was prepared using WARIS-H culture medium without soil extract. The test was carried out using five series of concentrations of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (30 mg/L; 15 mg/L; 7,5 mg/L; 3,75 mg/L; 1,87 mg/L). Three growth controls (culture medium and algae) were located near the sample with the highest concentration and another three growth controls were located near the samples with the lowest concentration. Each bioassay was conducted three times. In the test chamber, we assayed the acute toxicity to determine their stimulation and inhibition concentrations for *Scenedesmus* sp.

#### *Monitoring growth and pigment quantification*

Algal concentration was estimated by the mean number of cells obtained from direct cell count and using spectrophotometer absorbance values. Algal growth in the stock culture was checked by measuring the light transmission of the culture at 439, 642,5 and 663 nm every day using a spectrophotometer by in vivo absorbance (CECIL CE 2010).

Repeated measure ANOVA was used to test the differences observed among time series (16 days and 72hours) and the treatments (i.e. flask vs microplate and levels of P). Correlation among the density obtained from cell counting and light transmission were analyzed using a Spearman rank order correlation.

## **Results**

#### *Alga growth control test*

Results show that alga growth in flasks and microplate is comparable for a limited period of time: from day 9th the growth changes in the two, showing an increasing rate of growing in the flask; density and light transmission data yielded comparable results (Repeated measure ANOVA time\*treatment : cell count  $F(14,56)=95,5, p<0,001$ ; light transmission 439  $F(14,56)=724, p<0,001$ ; 642,5  $F(14,56)=1286, p<0,001$ ; 663  $F(14,56)=1190, p<0,001$ ).

#### *Alga toxicity test*

Repeated measure ANOVA results show that among the five series of concentrations, only high levels of P (30 mg/L and 15 mg/L) produced differences from the control growth for density and light transmission variables. The correlation

among density and light transmission of the culture at 24h, 48h and 72h were positive and significant at 24h only among density and carotenoids [439;rs= 0,82 p<0,05]; after 48h correlations are observed but they are not significant and at 72h no correlation was detected.

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

This study gives a first glance on the use of *Scenedesmus* sp. as a good bioindicator for the EFS (Filtering Ecosystem) of the Natural Park of Molentargius. The use of native algal strain isolated directly from the water system under investigation incorporates the existing pre-adaption of the species to local conditions into the bioassay itself, giving site-specific algal growth potentials. The *in vitro* test may be used to determine pollutant tolerance in algae confirming that the use of *Scenedesmus* sp. as the test organism it is both robust and reproducible. Previous comparative studies on algal toxicity testing using different algal species or different assay methodologies have been carried out by several authors [17-20]. Toxic effects of pollutants on algae are generally evaluated by phytotoxicity tests based on growth inhibition. Since growth inhibition is a global parameter, we can assume that other parameters than growth rate could be modified first. For example, it has been confirmed that chlorophyll a is reliable indicator of pollutant toxicity with chlorophyll b and carotenoids. Despite the widespread application of the algae growth-inhibition assay and despite the fact that there are international and national standards for this assay, only few toxicological data are available in literature about the Effective concentration (EC) values of orthophosphate [21]. The EC values of this substances were not observed with the concentrations we used, for this reason we are going to repeat the test with higher concentrations. Using the 24-well microplate a complete range-finding or definitive test can be accommodated (5 test concentrations and clean control, in triplicate replicates) and requires little space in the incubation chamber. The total volumes of test solution and inoculums required for each experiment are small and thus economical in test material and culture. The microalga *Scenedesmus* sp. grew well and according to acceptability criteria when deployed in a control chamber. However, it's important to clarify that in the growth control we noted different performance with the standardized flask and microplate test (Fig.1).

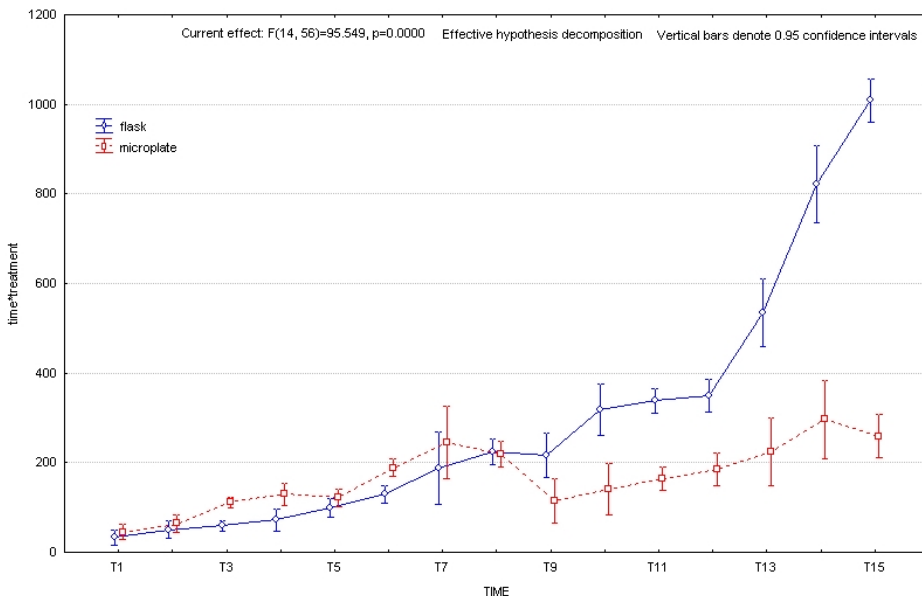


Figure 1 – Algal growth in flask and microplates

We can conclude that the use of microplate is not appropriate to evaluate chronic toxicity because gives different results of the flask. Moreover, the laboratory assay conducted following standard guidelines was able to confirm assay sensitivity and its potential use as an effective tool to be incorporated in ecological risk assessment studies. Preliminary results obtained confirm the chances to develop a future project to promote an integrative hazard assessment approach that combines information from both laboratory and in situ assays, as well as water-quality parameters. The new approach will increase the ecological realism of the resultant environmental decisions.

### Acknowledgements

This study has received a RAS research grant cofinanced by PO Sardegna FSE 2007-2013 L.R.7/2007 “Promozione della ricerca scientifica e dell’innovazione tecnologica in Sardegna.

Authors are grateful to the Molentargius-Saline Regional Natural Park for the support.

### References

- [1] W.J. Mitsch and J.G. Gosselink, *Wetlands*, 4th edn. John Wiley & Sons, Inc., New York (2006).
- [2] J. Vymazal, *Algae and Element Cycling in Wetlands*, Lewis Publishers, Ann Arbor (1995).
- [3] L.G. Goldsborough, G.G.C. Robinson, Patterns in wetlands. In: *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, (Eds R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe), Academic Press, New York (1996), pp. 77–117.
- [4] M.G. Kelly, A. Cazaubon, E. Coring, A. Dell’Uomo, L. Ector, B. Goldsmith, H. Guasch, J. Hurlimann, A. Jarlman, B. Kawecka, J. Kwandrans, R. Laugaste, E.A. Lindstrom, J. Leitao, M. Marvan, P. Padisak, J. Pipp, E. Prygiel, J. Rott, E. Sabater, S. Van Dam and

H. Vizinnet, Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe, *J. Appl. Phycol.* 10, [1998], pp. 215–224.

[5] C. Johnstone, J.G. Day, H. Staines and E.E. Benson, An in vitro oxidative stress test for determining pollutant tolerance in algae, *Ecological Indicators* 6, [2006], pp. 770–779

[6] R.J. Stevenson and J.P. Smol., Use of algae in environmental assessments, In: J. D. Wehr and R. G. Sheath, eds. *Freshwater Algae in North America: Classification and Ecology*, Academic Press, San Diego, [2003], pp.775-804.

[7] G.De Martis and B. Mulas, La flora del Parco Naturale Regionale Molentargius-Saline: stato attuale e confronto con le situazioni preesistenti, *Rend. Sem. Fac. Sci. Uni. Cagliari*. 78{2}, [2008].

[8] B. Surek and M. Melkonian, Culture Collection of Algae at the University of Cologne: A new collection of axenic algae with emphasis on flagellates, *Nova Hedwigia* 79, [2004], pp.77-92.

[9] G.I. McFadden, M. Melkonian, Culture Medium Waris-H., *Phycologia* 25, [1986], pp.551-557.

[10] V. Malavasi, First data on a Culture Collection of freshwater algae from Sardinia, Fifth European Phycological Congress, Rhodes, Greece, 4–9 September 2011. Posters, *European Journal of Phycology*, 46. Book of Abstract, [2011], p.170.

[11] ISO 5667-16-1998, Water quality - Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland [1998].

[12] ISO 8692-1989, Water Quality – Freshwater Algal Growth Inhibition Test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, [1989].

[13] ISO 14442-1999, Water quality-Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water, 1-14, Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, [1999].

[14] ISO 8692-2004, Water quality-Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae, 1-15, Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, [2004].

[15] P. Passarelli and A. Sbalchiero, Test di inibizione algale con *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Notiziario dei metodi analitici*, [2005], pp.1-8.

[16] UNI EN ISO 8692/2005, Qualità dell'acqua - Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari, Ente Nazionale Italiano Unificazione [2005].

[17] R. Rojicková, D. Dvorakova and B. Marsalek, The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the standard flask assay, *Environ. Toxicol. Water Quality* 13 (3), [1998], pp.235–241.

[18] S.W. Geis, K.L. Fleming, E.T. Korthals, G. Searle, L. Reynolds and, D.A. Karner, Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, No. 1, [2000], pp.36–41.

[19] A. Eisentraeger, D. Dott, J. Klein and S. Hahn, Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays, *Ecotoxicol Environ Saf* 54, [2003], pp.346–354

[20] E. Vendrell, D. Gòmez de Barreda Ferraz, C. Sabater and J. M. Carrasco, Effect of Glyphosate on Growth of Four Freshwater Species of Phytoplankton: A Microplate Bioassay, *Bull Environ Contam Toxicol* 82, [2009], pp.538–542.

[21] E.W. Becker, *Microalgae*, Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, [1994].

# PROFESSIONAL EXPOSURE TO BASALTIC ROCKS: ASSESSMENT WITH THE MICROTOX® SOLID PHASE TEST.

by C. Ledda<sup>a</sup>\*, V. Rapisarda<sup>b</sup>, M. Zuccarello<sup>a</sup>, R. Fallico<sup>a</sup>, M. Fiore<sup>a</sup>, M. Ferrante<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Department "G.F. Ingrassia" – Hygiene and Public Health, University of Catania, Italy.

<sup>b</sup> Department of Internal Medicine and Systemic Diseases – Occupational Medicine, University of Catania, Italy.

\* Corrisponding author: Caterina Ledda- Department "G.F. Ingrassia" – Hygiene and Public Health, University of Catania, Italy . Via Santa Sofia, 87 – 95123 Catania cledda@unict.it.

---

**Abstract** - The aim of this work is to assess the potential ecotoxicological effects of dust basaltic. The Microtox® solid phase test was used to evaluate the toxicity effect on basaltic rocks suspensions. Four samples were taken during the activity of digging for a road tunnel: A [Powder residual basalt stone], B [Volcanic ash], C [Mixed Material: basalt stone and cement], D [Cement]. Were investigated by scanning electron microscopy (SEM) equipped with energy dispersive X-ray analysis (EDX). Particles were identified and characterized by their morphology and elemental compositions. The results show that a higher concentration of Fe, Ca and Mg in the rocks makes negative effects on *Vibrio fischeri*.

Keywords: *Vibrio fischeri*; Microtox; Basaltic stone; Basaltic Ash; Work in the tunnel

## Introduction

Studies conducted on the resident population in the Etna area on exposure to ash from the activity of the volcano have shown an increase of acute respiratory and cardiovascular [1,2], with accumulation of heavy metals in the airways [3]. In a recent study Censi et al. [4] have suggested that to inhale airborne particulate product eruption of Mount Etna may be responsible for fibrotic processes in the lung. Have not yet been studied possible effects on the health of workers engaged in the digging of basaltic rocks resulting from the eruptions of Etna. Etna basaltic rocks are composed essentially of: SiO<sub>2</sub> 45-52%, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 14%; CaO 10% , FeO 5-14%, MgO 5-12%, alkali 2-6%, TiO<sub>2</sub> 0,5-2% [5,6].

In many risk assessment studies [7-12], toxicity tests are associated with chemical data in the framework of tiered decision since bioassays provide ecologically relevant information and are rapid and cost-effective screening tools.

The aim of the present paper is to assess ecotoxicological effects on suspensions of rock. The Microtox® solid phase test (MSPT) was used since it allows an evaluation of the toxicity of re-suspended rock. In this test the bioluminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) can have contact with toxicants both in the particulate and dissolved phases. Moreover, the MSPT is a widely accepted toxicity test in environmental monitoring for its ecological relevance and sensitivity [13,14].

## ***Materials and methods***

### *Sampling*

Four rock samples (A, B, C and D) were provided by provided by Istitute of Occupational Safety and Health of University of Catania when workers digging the subway tunnel of Catania.

In detail the samples are:

- A) Powder residual basalt stone.
- B) Volcanic ash.
- C) Mixed Material (basalt stone and cement).
- D) Cement.

### *Characterization of the sample*

The samples were prepared with gold coating under vacuum to ensure image quality (due to the excellent electrical conductivity of gold). La caratterizzazione morfologica delle particelle è examined by electron scanning microscopy using Cambridge Stereoscan 360.

The chemistry characterization of particle has been analyzed by SEM coupled with EDX Oxford Instruments INCA Energy. Therefore were acquired spectra show the composition of the rocks.

### *MSPT*

The MSPT was performed using the standard protocol of Azur Environmental (1998) and light emission was measured after 15 min for each sample. Detailed experimental procedure was reported in Mamindy-Pajany et al. (2011). Effective concentration required to induce toxic effect on 50% of the population (EC50) was determined. Toxic Unit at 50% (TU50) of the population exhibiting a response was determined as 100/EC50 to provide values directly correlated to the toxicity magnitude. When samples were colored at the concentration close to the EC50 value, absorbance correction was realized using the color correction procedure and Microtox Omni Software (Azur Environmental, 1998) [15].

### *Data analysis*

Statistical analyses concerning spectra and TU50s were carried out using the software R. Data were tested for homogeneity of variance and normal distribution.

In the present study cannot be combined with any test statistically significant due to the number of samples, for this reason will be given only descriptive statistics.

### **Results**

The results of SEM analysis are summarized in Table 1 and the trend of the concentrations in weight% is shown in the graph (Figure 1). The results reported are the mean of ten readings for sample. Standard deviation of the results of microanalysis in % was calculated. It should be noted that for the elements: C, Si, Ca, Fe, O, Si and Mg standard deviation is <3 (Table1). All re-suspended rocks samples induced acute toxicity effects in the MSPT (Figure 2 and Table 2).

### **Discussion**

From the results of the MSPT emerges that the samples C and D have a very high toxicity. It is possible to see in Figure 3 how the elements Ca, Fe and Mg are growing in proportion to the toxicity of the samples. Is not the same for the elements O, C and Si. The ecotoxicological approach is new in the literature for the study of dust and to assess the occupational exposure of workers digging tunnels.

Table 1: Samples result in weight% of spectra analysis

	<i>C</i>	<i>Na</i>	<i>Mg</i>	<i>Al</i>	<i>Si</i>	<i>S</i>	<i>Cl</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Ti</i>	<i>Mn</i>	<i>Fe</i>	<i>W</i>	<i>O</i>	<i>P</i>	<i>Nb</i>	<i>Br</i>
Sample A	8,79	5,98	2,36	14,2	27,79	0,00	0,59	7,80	11,72	0,52	0,60	16,64	2,48	51,42	1,81	0,99	0,00
Sample B	9,11	4,86	4,61	11,25	23,54	0,00	0,24	4,58	12,99	0,70	0,00	14,36	2,53	43,26	0,00	0,00	2,11
Sample C	0,00	7,51	5,05	14,72	30,82	0,00	0,58	10,20	36,70	1,64	0,00	33,02	3,24	46,71	0,00	0,00	0,00
Sample D	24,04	5,78	7,52	9,88	23,80	0,83	0,99	3,79	32,66	5,01	0,61	24,71	1,97	68,33	0,00	0,00	0,00
St. Dev.	9,97	1,10	2,12	2,33	3,48	0,42	0,31	2,97	13,00	2,09	0,35	8,48	0,52	11,12	0,91	0,50	1,06

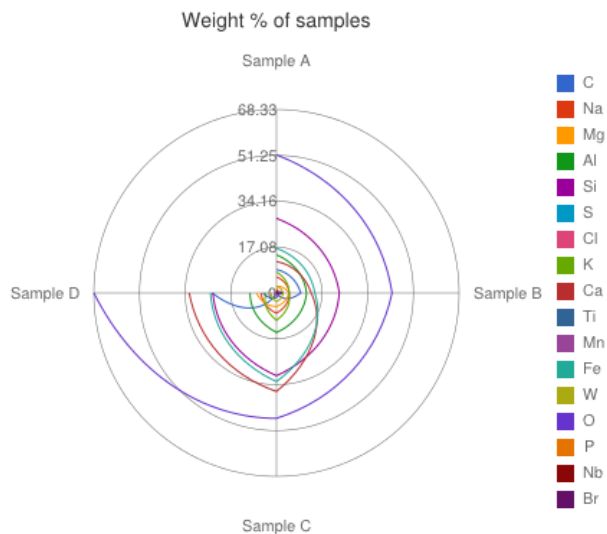


Figure 1: Trend of the concentrations in weight%



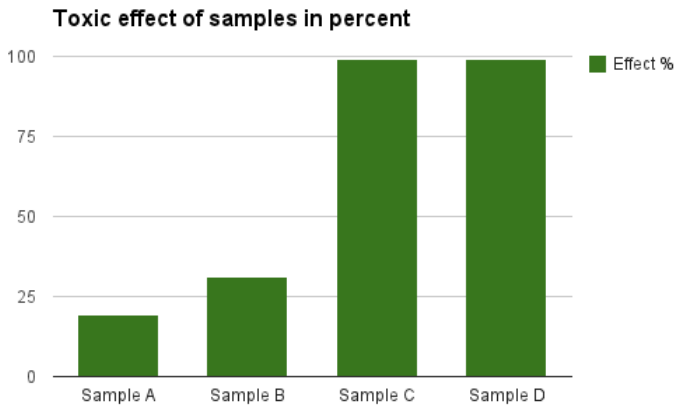


Figure 2: *Vibrio fischeri* results

Table 2: Toxic effect of samples in percent

	%
Sample A	19,31
Sample B	31,22
Sample C	99,05
Sample D	98,95

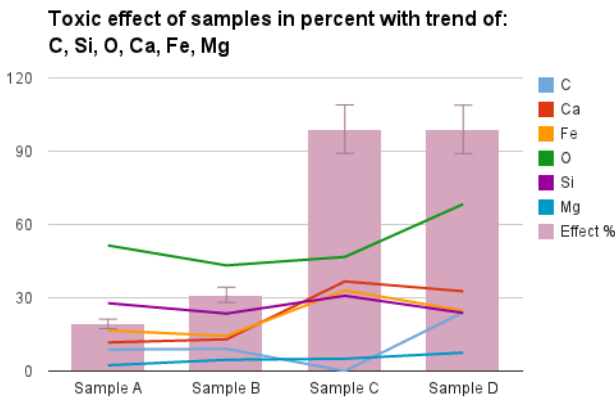


Figure 3: Trend of the elements with a standard deviation <math><3</math>

### Conclusion

In conclusion it is appropriate to continue to carry out monitoring to increase ecotoxicological data in the literature so far are limited as part of dredging and sediment. The type of occupational exposure is different as it is known that the powders to come into direct contact with humans.

## ***Bibliography***

1. Hansell AL, Horwell CJ, Oppenheimer C. The health hazards of volcanoes and geothermal areas. *Occup Environ Med.* 2006; 63: 149-56.
2. Fano V, Cernigliaro A, Scondotto S, Cuccia M, Forastiere F, Nicolosi A, Oliveri C, Scillieri R, Distefano P, Perucci CA. Health effects of environmental contamination due to volcanic ash of Mount Etna in autumn 2002. *Epidemiol Prev* 2005; 29: 180-7.
3. Censi P, Zuddas P, et al. Source and nature of inhaled atmospheric dust from trace element analyses of human bronchial fluids. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 6262-7.
4. Censi P, Tamburo E, Speziale S, Zuddas P, Randazzo LA, Punturo R, Cuttitta A, Aricò P. Yttrium and lanthanides in human lung fluids, probing the exposure to atmospheric fallout. *J Hazard Mater* 2011; 186: 1103-10.
5. Busà T, Clocchiatti R, Cristofolini R. Low P and high P alkaline magmas from Monte Etna: their origin and evolution from the study of mineralogy and chemistry of lavas and of olivine-trapped inclusions. *Min Mineral* 1999; 68: 163-183.
6. Schiano P, Clocchiatti R, Ottolini L. Transition of Mount Etna lavas from a mantle-plume to an Island-arc magmatic source. *Nature* 2001; 412: 900-04.
7. Perrodin, Y., Babut, M., Bedell, J.-P., Bray, M., Clement, B., Delolme, C., Devaux, A., Durrieu, C., Garric, J., Montuelle, B., 2006. Assessment of ecotoxicological risks related to depositing dredged materials from canals in northern France on soil. *Environ. Int.* 32, 804–814.
8. Apitz, S., Carlon, C., Oen, A., White, S., Susanne Heise, D., 2007. Strategic framework for managing sediment risk at the basin and site-specific scale. *Sustain. Manage. Sediment Resour.*, 77–106.
9. Macken, A., Giltrap, M., Foley, B., McGovern, E., McHugh, B., Davoren, M., 2008. An integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments: validation of established marine bioassays for the monitoring of Irish marine sediments. *Environ. Int.* 34, 1023–1032.
10. Caeiro, S., Costa, M., DeValls, A., Repolho, T., Gonçalves, M., Mosca, A., Coimbra, A., Ramos, T., Painho, M., 2009. Ecological risk assessment of sediment management areas: application to Sado Estuary, Portugal. *Ecotoxicology* 18, 1165–1175.
11. Choueri, R., Cesar, A., Abessa, D., Torres, R., Riba, I., Pereira, C., Nascimento, M., Morais, R., Mozeto, A., DeValls, T., 2010. Harmonised framework for ecological risk assessment of sediments from ports and estuarine zones of North and South Atlantic. *Ecotoxicology* 19, 678–696.
12. Yannick Mamindy-Pajany, Florence Geret, Michèle Roméo, Charlotte Hurel, Nicolas Marmier. Ex situ remediation of contaminated sediments using mineral additives: Assessment of pollutant bioavailability with the Microtox solid phase test *Chemosphere* Volume 86, Issue 11, March 2012, Pages 1112–1116
13. Libralato, G., Losso, C., Arizzi Novelli, A., Citron, M., Della Sala, S., Zanotto, E., Cepak, F., Volpi Ghirardini, A., 2008. Ecotoxicological evaluation of industrial port of Venice (Italy) sediment samples after a decontamination treatment. *Environ. Pollut.* 156, 644–650.
14. Ghirardini, A.V., Ghirardini, M., Marchetto, D., Pantani, C., 2009. Microtox solid phase test: effect of diluent used in toxicity test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 851–861.
15. Azur Environmental, 1998. *Microtox Acute Toxicity Test Guide, Users Manual.* Carlsbad, USA.

# TAVOLA ROTONDA 1: CERTIFICAZIONE, ACCREDITAMENTO E PROVE INTERLABORATORIO

*di Renato Baudo e Marco Faimali*

---

A differenza delle prove in chimica e in microbiologia, non esistono attualmente linee guida proposte da ACCREDIA per l'accREDITamento di saggi ecotossicologici. Pertanto, è stato costituito un gruppo di lavoro UNICHIM che si propone di redigere tali linee guida. La conclusione dei lavori è prevista per la primavera 2013. Dalla discussione è emerso un particolare interesse per l'organizzazione di confronti interlaboratorio per i saggi ecotossicologici, per i quali attualmente non esistono provider accreditati ACCREDIA, ma che vengono ritenuti indispensabili per l'inserimento in qualunque normativa, estendendo il percorso di standardizzazione inserito nella attuale revisione del DD del 24.12.2003, ovvero il DD 24.11.2011, relativo all'impiego in mare di prodotti assorbenti e disperdenti. In tal senso si propone di chiedere un incontro tecnico con ACCREDIA e MATTM per discutere la possibilità di ottenere un percorso diversificato di accREDITamento in base allo scopo dei laboratori e agli Enti coinvolti (sviluppo biosaggi, intercalibrazione, applicazione dei biosaggi), sulla base di una bozza di un testo da condividere e predisporre allo scopo. Sollecitata dai partecipanti, ISPRA si ripropone di verificare la possibilità di organizzare questo tipo di confronti interlaboratorio e di optare per tale attività altri soggetti che consentano di estendere la partecipazione anche a laboratori non ARPA. Dovrebbe essere coinvolta anche la struttura ISPRA che si occupa di materiali di riferimento, per la preparazione di tossici di riferimento e campioni ciechi. Infine, una prospettiva interessante potrebbe essere quella di organizzare contemporaneamente 3 confronti interlaboratorio (su batteri bioluminescenti, alghe e crostacei), così da consentire per la prima volta un confronto su una batteria di saggi, seppur minimale.

# GLI STRUMENTI PER L'ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ DEL DATO: SCHEMI DI CERTIFICAZIONE E DI ACCREDITAMENTO.

*di E. Raso, M.G. Simeone, V. Ubaldi, M. Belli*

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma , Italy –  
mariagabriella.simeone@isprambiente.it

---

**Abstract** - L'adozione di regole che assicurino la qualità e la sicurezza di prodotti e servizi è un problema sempre più pressante e con grosse ricadute economiche. In questo contesto un aspetto rilevante è l'autorevolezza e l'armonizzazione dei dati e delle informazioni prodotte. In ambito di controlli e sicurezza per l'uomo e l'ambiente, un valido supporto viene offerto da alcuni strumenti normativi, siano essi volontari o cogenti, tesi a fissare e armonizzare precisi requisiti tecnici e gestionali di qualità.

Parole chiave: accreditamento, certificazione, Buona Pratica di Laboratorio, UNI CEI EN ISO/IEC 17025

## *Introduzione*

Negli ultimi anni a fronte di un mercato sempre più complesso e globalizzato si rileva un aumentata richiesta di beni e servizi che rispondano a precisi standard di qualità e di sicurezza per la salute umana e l'ambiente. Un tassello importante in questo quadro è l'autorevolezza e l'armonizzazione dei dati e delle informazioni a corredo di tali prodotti e servizi. In generale gli strumenti per perseguire questo obiettivo sono l'adozione di norme o prescrizioni volontarie o cogenti. Seguire una norma, sia essa volontaria o cogente, assicura che il prodotto o il servizio risponde a requisiti specifici di qualità e di sicurezza. Questo semplifica i controlli, migliora la libera circolazione dei prodotti e contribuisce ad una collaborazione e uno scambio continuo tra operatori di diversi paesi. L'attestazione che un determinato organismo di valutazione della conformità soddisfi i criteri stabiliti da norme armonizzate, accreditamento, è regolata da specifici atti normativi. In Europa l'accREDITamento e la vigilanza del mercato per quanto riguarda la commercializzazione dei prodotti è regolamentato dal Regolamento n. 765/2008. Ai sensi di tale Regolamento i Paesi debbono dotarsi di un ente unico di accREDITamento. In Italia l'ente unico di accREDITamento è ACCREDIA che valuta la conformità di organismi di certificazione e ispezione e dei laboratori di prova e di taratura. Questa, aderendo agli Accordi di Mutuo Riconoscimento, assicura anche che l'operato di tali organismi sia riconosciuto a livello europeo e internazionale. Con la certificazione è poi l'organismo di valutazione a certificare che una determinata organizzazione o un processo sono gestiti in conformità a quella specifica norma.

Il campo volontario si basa su norme tecniche volontarie, aggiornate e consensuali, ovvero frutto del coinvolgimento delle parti interessate, emesse da organismi nazionali, europei o internazionali che fissano prescrizioni e requisiti tecnici specifici per prodotti, processi e servizi.

La norma tecnica UNI CEI EN ISO/IEC 17025 ricade nel campo volontario e fissa i requisiti per un laboratorio di prova/taratura. Un laboratorio accreditato è un laboratorio sottoposto periodicamente ad una verifica di conformità da parte di ACCREDIA sul rispetto dei requisiti della norma. Un laboratorio che per l'esecuzione di una certa prova o taratura opera in conformità ai requisiti della ISO/IEC 17025 assicura che questa è eseguita con competenza, in conformità a norme riconosciute, utilizzando un sistema di gestione qualità conforme ai principi della UNI EN ISO 9001 e con risorse adeguate.

Nel caso del campo cogente invece i requisiti sono obbligatori e definiti per legge; gli strumenti amministrativi di riferimento in Europa sono i Regolamenti e le Direttive. In questo caso per l'immissione sul mercato di un certo prodotto in uno dei Paesi dell'Unione, l'autorità designata deve rilasciare un'attestazione di conformità ai requisiti indicati nei Regolamenti o negli atti nazionali di recepimento delle Direttive.

La certificazione secondo la Buona Pratica di Laboratorio (BPL) per i laboratori che svolgono a fini regolatori studi e ricerche non clinici, per valutare la sicurezza per l'uomo e l'ambiente di una sostanza ricade invece nel campo cogente. L'ambito di applicazione riguarda la valutazione della sicurezza di sostanze e preparati cosmetici, farmaceutici, antiparassitari, medicinali ad uso veterinario, additivi alimentari, additivi per mangimi e solventi. In questo caso i centri che eseguono tali studi devono operare in conformità alla BPL e certificarsi presso l'autorità di riferimento. In Europa le Direttive di riferimento per le modalità di ispezione e verifica di conformità e l'applicazione dei principi di BPL sono la n. 9 e n.10 del 2004, che raccolgono e armonizzano tutte le prescrizioni della legislazione precedente, rendendo più semplice l'adozione a livello di singolo Paese. In Italia l'autorità per la BPL è presso il Ministero della Salute mentre le Direttive sono state recepite con il D.Lgs. n.50 del 2007. I principi nascono nel 1981 in ambito OECD nel quadro delle azioni per il mutuo riconoscimento dei dati e si applicano a tutte le fasi di realizzazione dello studio, dalla programmazione alla pubblicazione dei risultati. Obiettivo dei principi è fornire autorevolezza ai dati ed ai risultati ottenuti da uno studio. Per questo è richiesto che gli studi siano eseguiti secondo una programmazione, da personale competente e con responsabilità e funzioni dichiarate, adottando un sistema di gestione del laboratorio, seguendo procedure scritte e curando la registrazione e l'archiviazione dei dati e delle informazioni, così da consentire una rigorosa e oggettiva ricostruzione di tutte le fasi sperimentali anche dopo la chiusura dello studio stesso.

### ***L'accreditamento secondo la ISO17025***

Con la conformità alla norma tecnica UNI CEI EN ISO/IEC 17025 un laboratorio di prova o taratura documenta di avere un sistema di gestione per la qualità, di avere eseguito la prova o la taratura utilizzando metodi che soddisfano l'esigenza del cliente e idonei allo scopo della prova stessa, che tali metodi sono normati, o ufficiali o sviluppati dal laboratorio stesso e validati e che i risultati sono tecnicamente validi; l'attenzione è sulle misure sperimentali e sui risultati prodotti.

I requisiti fissati dalla norma sono sia di tipo gestionali che tecnici (*Figura 1*). Per i requisiti gestionali il laboratorio deve avere personale direttivo e tecnico adeguato, un responsabile per la qualità e un sistema di gestione documentale adatto al campo delle sue attività. Deve stabilire e mantenere attive procedure per il controllo e la gestione di tutti i documenti e registrazioni, dotarsi di un manuale della qualità, di procedure scritte per le attività di prova o taratura compresa la gestione delle apparecchiature. Deve poi dotarsi di una politica e di procedure per la tenuta sotto controllo delle attività di prova e/o di taratura e gestire le non conformità alle proprie procedure o ai requisiti concordati con il cliente. Deve inoltre dotarsi di politiche e

procedure per il miglioramento continuo fissando degli obiettivi per la qualità, individuando azioni correttive e preventive, analizzando i risultati e gli audit. Infine il laboratorio si deve dotare di politiche e procedure per una attività di riesame periodica, per accertare che le operazioni continuino a soddisfare i requisiti del sistema di gestione, e della norma, basandosi tra l'altro su risultati di audit interni e di confronti interlaboratorio o di prove valutative.

Per i requisiti tecnici il laboratorio deve tenere sotto controllo tutti quei fattori che contribuiscono a vario titolo a determinare la correttezza e l'affidabilità delle prove e/o delle tarature, ovvero i metodi e le procedure di prova e di taratura, la formazione, l'addestramento e la qualifica del personale, la scelta e la taratura delle apparecchiature da utilizzare, la postazione di lavoro e le condizioni ambientali. Il laboratorio deve poi dotarsi di strumenti e procedure per monitorare la validità delle prove e delle tarature effettuate. Rientrano in tali strumenti l'utilizzo regolare di materiali di riferimento certificati e la partecipazione a programmi di confronti interlaboratorio. Infine i risultati della prova o taratura devono essere generalmente registrati in un rapporto di prova o in un certificato di taratura insieme alle informazioni sui metodi utilizzati e a tutte quelle informazioni necessarie alla loro interpretazione.

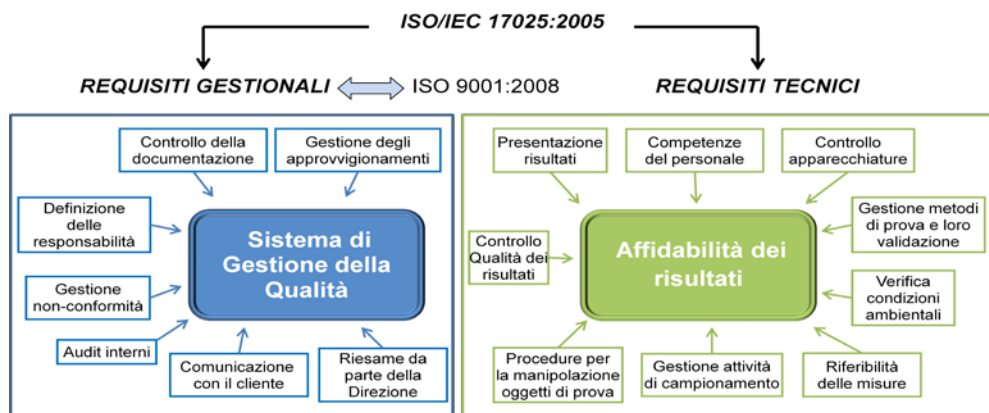


Figura 1

### La certificazione secondo la BPL

I Principi della BPL sono illustrati in una serie di linee guida e documenti, la cui redazione e revisione è curata da un gruppo di lavoro di esperti presso l'OECD. Tali documenti trattano tutti gli argomenti necessari per comprendere e applicare i requisiti di conformità alla realizzazione di uno studio non clinico e forniscono indicazioni all'autorità di controllo per la verifica della conformità.

Punto centrale della certificazione è garantire che lo studio sia eseguito in qualità, assicurando l'integrità e la validità dei risultati ottenuti. A tal fine i requisiti sono sia sulla struttura e gestione del centro che sulla conduzione dello studio. Il centro deve avere risorse e spazi adeguati per consentire una corretta esecuzione di tutte le attività collegate allo svolgimento dello studio e deve essere dotato di un sistema di gestione per la qualità. Per lo studio è richiesto che sia affidato a personale di adeguata formazione, secondo una attenta programmazione e che tutti i risultati o le informazioni collegate alla conduzione dello stesso siano registrate e archiviate. Tutte le funzioni coinvolte (Figura 2), indipendenti l'una dall'altra e di competenza adeguata

e documentata, devono essere chiaramente indicate così come le loro responsabilità: il direttore del centro, il direttore dello studio, l'unità per l'assicurazione della qualità, il personale addetto allo svolgimento dello studio e l'archivista. L'attività del centro deve essere regolata da procedure scritte, correttamente gestite e autorizzate dal direttore del centro. La programmazione dello studio deve essere in forma scritta e documentata e affidata a un esperto, il direttore dello studio, che ha la responsabilità di condurre lo studio in conformità ai principi stessi. All'archivista ha la responsabilità di conservare adeguatamente tutte le informazioni legate all'esecuzione di uno studio così da rendere possibile a posteriori la completa ricostruzione dello studio stesso. All'unità della qualità la responsabilità di definire ed attuare un programma per il monitoraggio delle attività adeguato allo scopo. Infine le risultanze dello studio devono essere riportate in una relazione, firmata e datata, completa di tutte le informazioni necessarie a ripercorrere lo studio dalla sua programmazione ai risultati finali.

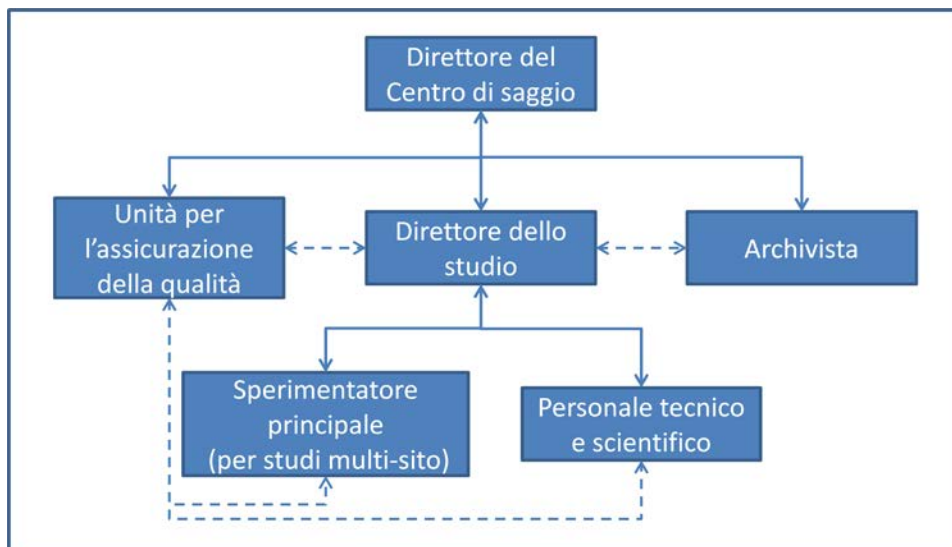


Figura 2

### ***Il REACH e la qualità dei dati***

Il REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) CE n. 1907/2006, è un esempio rappresentativo di quanto esposto. Il regolamento ha una grossa ricaduta sul mercato poiché richiede che le sostanze chimiche fabbricate o importate in quantitativi pari o superiori ad una tonnellata l'anno, prima di essere commercializzate siano caratterizzate ai fini della loro pericolosità e registrate in una banca dati affidata all' ECHA. Alla base della registrazione la produzione e presentazione di un fascicolo con informazioni dettagliate sulle proprietà della sostanza, la sua pericolosità e la gestione dell'eventuale rischio collegato al suo uso. Nel fascicolo devono pertanto essere riportati anche i risultati delle prove chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche (allegati da VII a X) eseguiti per definire i rischi potenziali per la salute umana e per l'ambiente. Saggi che devono essere eseguiti nel rispetto della direttiva 2004/10/CE, ovvero dei principi della Buona Pratica di Laboratorio (BPL) o secondo altre norme internazionali, riconosciute equivalenti dalla Commissione o dall'Agenzia.

Un richiamo ad operare in conformità ai requisiti della 17025 è infine anche nell'Accordo Stato Regioni e Province autonome del 29 ottobre 2009, che regola per l'Italia le attività di vigilanza per il REACH. Nell'articolo è infatti richiesto che i laboratori incaricati dalle regioni e province autonome per le attività analitiche di controllo, utilizzino i metodi di campionamento e analisi indicati dal Regolamento oppure normati o validati e partecipino a esercizi valutativi interlaboratorio.

### ***Conclusioni***

In generale l'adozione di un sistema di qualità anche se onerosa, presenta numerosi vantaggi legati non solo ad una maggiore autorevolezza dei dati ma anche ad aspetti di economicità e razionalizzazione delle attività. Decidere se e quale sistema adottare richiede una approfondita analisi delle attività e degli scopi prevalenti che si intendono perseguire, accompagnati da una buona conoscenza dei punti cardine e degli obiettivi dello schema di qualità in questione. Nel caso degli schemi presentati, la scelta di quale sistema dotarsi è strettamente legata agli obiettivi del laboratorio stesso.

Va comunque sottolineato come la normativa europea sempre più esplicitamente chieda che i laboratori che operano nel campo della caratterizzazione e del monitoraggio ambientale, seguano schemi per la qualità del dato e partecipino a esercizi di prove valutative, non solo per assicurare la validità dei dati ottenuti ma anche per assicurare una base comune di mutuo riconoscimento, confronto e collaborazione tra gli operatori.

### ***Bibliografia***

1. Direttiva 2004/9/ce del parlamento europeo e del consiglio dell'11 febbraio 2004 concernente l'ispezione e la verifica della buona pratica di laboratorio (BPL)
2. Direttiva 2004/10/CE "Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative all'applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche".
3. Regolamento (CE) n. 1907/2006 del PARLAMENTO europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE.
4. Decreto Legislativo 2 marzo 2007, n. 50 "Attuazione delle direttive 2004/9/CE e 2004/10/CE, concernenti l'ispezione e la verifica della buona pratica di laboratorio (BPL) e il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative all'applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche".
5. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring:1-15
6. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 - Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura



# I PRINCIPI DELLA CERTIFICAZIONE DELLA BUONA PRATICA DI LABORATORIO (BPL): UN PROGETTO DI FORMAZIONE A DISTANZA.

di M.G. Simeone, V. Ubaldi, E. Raso, D. Antonietti, S. Loffredi  
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma , Italy -  
mariagabriella.simeone@isprambiente.it

---

**Abstract** - Nell'ambito delle attività di supporto tecnico-scientifico affidate ad ISPRA per agevolare l'attuazione del REACH (Regolamento CE n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche) è stato realizzato un corso di formazione a distanza sui principi della buona pratica di laboratorio. La Buona Pratica di Laboratorio (BPL) costituisce un sistema di gestione della qualità riguardante il processo organizzativo e le condizioni in cui gli studi vengono programmati, eseguiti, controllati, registrati, riportati ed archiviati. Il corso, realizzato su una piattaforma e-learning Moodle, fornisce gli elementi conoscitivi di base dello schema di certificazione BPL descrivendone gli elementi chiave.

Parole chiave: BPL, Buona Pratica di Laboratorio, Reach, certificazione, formazione.

## *Introduzione*

Per un laboratorio che voglia eseguire studi non clinici ai fini regolatori sulla sicurezza per l'uomo e per l'ambiente, la conformità alla Buona Pratica di Laboratorio (BPL) è un obbligo di legge. Il progetto per la realizzazione di un corso di formazione sugli elementi conoscitivi di base dello schema di certificazione sulla BPL, nasce nell'ambito delle azioni di supporto tecnico-scientifico affidate ad ISPRA ( D.M. 22 novembre 2007 - G.U. n. 12 del 15 gennaio 2008), per l'attuazione all'entrata in vigore del REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals - CE n. 1907/2006) che regola l'immissione in commercio delle sostanze chimiche. Il richiamo a seguire tali principi è nell'articolo 13, relativamente alle modalità di esecuzione dei test *in vitro*, da usare in alternativa, ove possibile, a quelli *in vivo*, e delle analisi ecotossicologiche e tossicologiche per acquisire le informazioni relative alle proprietà tossiche delle sostanze.

La Buona Pratica di Laboratorio ha origine negli Stati Uniti d'America (USA) negli anni '70 per assicurare la qualità dei dati ottenuti da studi non clinici sulla sicurezza di pesticidi, prodotti chimici, intermedi, principi attivi, etc. Furono poi ripresi dall'OECD (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) agli inizi degli anni 80 nell'ambito delle azioni per il mutuo riconoscimento e scambio di dati degli studi di sicurezza non clinici nei Paesi Membri, al fine di facilitare il commercio dei prodotti chimici. Alla base dei Principi, delineare le regole per la conduzione degli studi per evitare differenze che possano pregiudicare la qualità e l'autorevolezza dei risultati. Il lavoro proseguì e dopo circa quindici anni, nel 1997, furono pubblicati una serie di

documenti esplicativi e linee guida per una più agevole ed omogenea applicazione delle regole, Decisione [C(97)186/Final]. Molti dei paesi membri dell'OCSE hanno recepito nella propria legislazione i Principi di BPL. Per l'Unione Europea il primo recepimento formale risale al 1986, attualmente è regolamentato dalla Direttiva 2004/9/CE concernente l'ispezione e la verifica della Buona Pratica di Laboratorio e dalla Direttiva 2004/10/CE relativa alla sua applicazione. In Italia la norma di recepimento delle due Direttive è il D.Lgs n. 50 del 2007.

Il corso, progettato e articolato principalmente per gli operatori delle ARPA/APPA, è finalizzato a promuovere le conoscenze di base in materia di BPL fornendo indicazioni sui requisiti fondamentali per la sua applicazione, sull'organizzazione e gestione del Centro di saggio, sulla gestione documentale di tutti i processi inerenti uno studio, sulla gestione dei processi per l'assicurazione della qualità. Nel corso sono infine riportati alcuni accenni in merito alle differenze ed analogie con l'accreditamento UNI CEI EN ISO/IEC 17025. La prima edizione del corso, si è svolta nella primavera del 2012. Per tutta la durata, con cadenza almeno settimanale, è stato effettuato un monitoraggio accurato del processo formativo per individuare eventuali criticità nel percorso di formazione progettato, per testare e valutare possibili problematiche di tipo tecnico e per dare un supporto diretto ai corsisti.

### ***Aspetti tecnici e struttura e del corso BPL***

Il corso è stato realizzato attraverso la piattaforma e-learning Moodle (software Open Source Course Management System CMS), scelto in quanto efficace strumento di creazione e conduzione di corsi di formazione on-line e perché estremamente diffuso sia nel mondo accademico che in quello istituzionale.

Moodle è utilizzato sotto licenza GNU (General Public License) e la versione utilizzata è la 2.0.3. L'architettura tecnologica, di sistema e di rete, ha garantito adeguate performance di fruizione dei servizi permettendo un numero adeguato di utenti contemporanei per ogni sessione del corso di formazione. Il sistema ha inoltre garantito, attraverso una piattaforma tecnologica Learning Management System (LMS) in grado di erogare contenuti didattici rispondenti a specifici standard supportanti Learning Objects in formato XML (eXtensible Markup Language), di erogare e tracciare punti intermedi di verifica dell'apprendimento, con registrazione dei risultati conseguiti, fino al superamento di tutti i punti di verifica del corso, nonché la capacità di archiviazione storica dei risultati finali.

Si evidenzia, infine, che i contenuti del corso sono stati strutturati in modo tale che fossero rispondenti ai criteri di accessibilità.

Per la fruizione del corso, accessibile dal sito dell'ISPRA, sono richieste specifiche credenziali di accesso. La registrazione avviene on-line, tramite una procedura di identificazione univoca e sicura che consente di accedere a tutte le componenti del sistema ed ai relativi servizi senza la necessità di ulteriori procedure di identificazione. La durata della prima edizione è stata stabilita in tre mesi (15 maggio - 15 agosto 2012) a partire dal momento della registrazione. All'accesso è subito disponibile la guida alla fruizione del corso, la presentazione del corso stesso, il glossario, la sezione dedicata ai link di interesse, nonché i documenti normativi di riferimento.

Il corso descrive i fondamenti del sistema di certificazione riferendosi a quanto richiesto dalla normativa vigente e prevede a completamento del percorso formativo il rilascio dell'attestato di frequenza.

I contenuti sono stati strutturati in cinque Moduli, di cui il primo introduttivo, suddivisi a loro volta in Unità Formative che affrontano tematiche chiave del processo di certificazione. Le Unità Formative sono state progettate come slides Power Point in formato Flash, in un numero compreso tra 5 e 15 ed accompagnate da una lettura con sintetizzatore vocale. I contenuti di alcune unità formative sono stati ampliati attraverso specifiche sezioni di "Approfondimento" (tabella1).

Tabella 1

<b>MODULO 1 INTRODUZIONE</b>		
<b>MODULO 2 ORGANIZZAZIONE DEL CENTRO DI SAGGIO E FIGURE COINVOLTE</b>	UF1: LA DIREZIONE DEL CENTRO DI SAGGIO	<b>APPROFONDIMENTI:</b> - RESPONSABILITÀ DELLA DIREZIONE DEL CENTRO DI SAGGIO - RESPONSABILITÀ DEL DIRETTORE DELLO STUDIO
	UF2: IL DIRETTORE DELLO STUDIO	
	UF3: IL COMMITTENTE	
	UF4: IL RICERCATORE PRINCIPALE	
	UF5: IL PERSONALE ASSEGNATO ALLO STUDIO	
	UF6: L'ARCHIVISTA	
<b>MODULO 3 PROGRAMMAZIONE E DOCUMENTAZIONE</b>	UF1: DOCUMENTI GENERALI DI PRESENTAZIONE DEL CENTRO	<b>APPROFONDIMENTI:</b> - PROGRAMMA DELLO STUDIO - PROCEDURE OPERATIVE STANDARD (POS) - RELAZIONE FINALE
	UF2: PROGRAMMA DELLO STUDIO	
	UF3: PROCEDURE OPERATIVE STANDARD	
	UF4: RELAZIONE FINALE	
<b>MODULO 4 STRUTTURA, SOSTANZE E SISTEMI DI SAGGIO</b>	UF1: STRUTTURE ED IMPIANTI	<b>APPROFONDIMENTI</b> - STRUTTURE E IMPIANTI - SOSTANZE IN ESAME E DI RIFERIMENTO - CONFORMITÀ DEI FORNITORI - SISTEMI DI SAGGIO - SISTEMI INFORMATICI
	UF2: ATTREZZATURE	
	UF3: SOSTANZE IN ESAME E DI RIFERIMENTO	
	UF4: SISTEMI DI SAGGIO	
	UF5: SISTEMI INFORMATICI	
<b>MODULO 5 UNITÀ DI ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ</b>	UF1: COMPITI E RUOLI DELL'UNITÀ DI ASSICURAZIONE DI QUALITÀ	<b>APPROFONDIMENTI</b> - COMPITI E RUOLI DELL'UNITÀ DI ASSICURAZIONE DI QUALITÀ - LE ISPEZIONI
	UF2: ISPEZIONI	

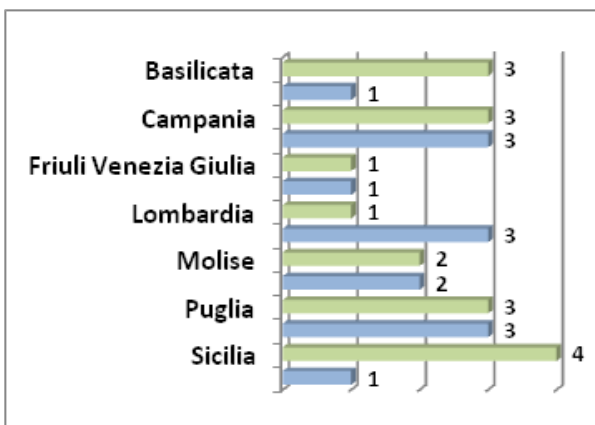
Al termine di ciascun modulo è stato predisposto un questionario autogestito sull'apprendimento dei temi trattati. L'utente accede ai moduli successivi solo se il

risultato della verifica è superiore al 70%. Nel caso di risultato inferiore, la verifica deve essere ripetuta.

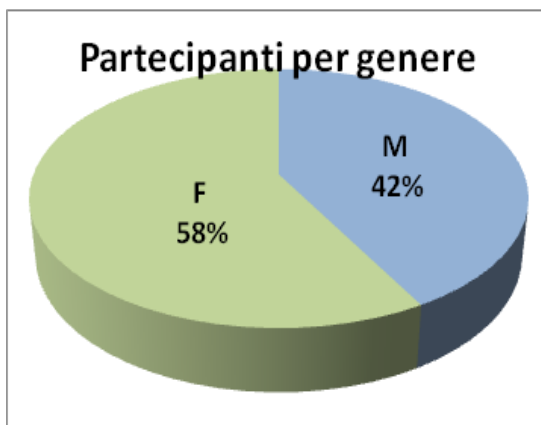
E' stato inoltre inserito un questionario di gradimento articolato in quattro sezioni: aspetti progettuali del corso, organizzazione del programma, piattaforma tecnologica, suggerimenti e commenti.

### ***Risultati***

Alla prima edizione del corso hanno aderito 14 ARPA (figura 1), distribuite su tutto il territorio nazionale, per un totale di 31 partecipanti; dall'analisi di genere è risultata una maggiore adesione all'iniziativa da parte del genere femminile (figura 2):



*Figura 1- Distribuzione partecipanti ARPA*



*Figura 2- Distribuzione dei partecipanti per genere*

Il questionario di gradimento è suddiviso in quattro sezioni di cui tre a domanda chiusa, con scala di valori da 1 a 5 con 1=Per niente e 5=Molto, ed una a domanda aperta. Gli aspetti indagati sono quelli progettuali (obiettivi formativi, rispondenza alle esigenze formative, utilità delle conoscenze acquisite), l'organizzazione del programma (successione degli argomenti, esaustività dei contenuti e degli

approfondimenti, congruenza delle metodologie didattiche] e sulla piattaforma tecnologica (usabilità e accessibilità, qualità dell'interfaccia, eventuali difficoltà di ordine tecnico). La sezione a domanda aperta invita a segnalare problematiche riscontrate, aspetti positivi e negativi del corso e a proporre eventuali suggerimenti.

Tutte le domande hanno avuto un riscontro positivo, ovvero con valori rientranti nelle categorie Abbastanza e Molto. Per il 77% dei corsisti gli obiettivi del corso sono risultati chiari e definiti già dalla presentazione e per l'80% i contenuti inseriti nel corso sono risultati coerenti con gli obiettivi formativi dichiarati (figura 3). Inoltre nell'81% dei casi il corso ha soddisfatto le esigenze formative dei discenti i quali, nella stessa percentuale, hanno ritenuto utili le conoscenze acquisite per la propria attività lavorativa. Per quanto riguarda l'efficacia delle tecniche e delle metodologie utilizzate, il 77% dei partecipanti si è dichiarato soddisfatto da tale aspetto e l'84% ha espresso un notevole gradimento per il materiale di approfondimento inserito per alcuni specifici argomenti. Tale giudizio positivo è dovuto probabilmente anche alla scelta di inserire delle sezioni apposite per approfondire argomenti che necessitavano di maggiore spazio di trattazione, evitando di appesantire eccessivamente la lettura delle unità formative.

Per quanto riguarda l'inserimento dei test di autovalutazione inseriti alla fine di ogni modulo, il giudizio dei partecipanti al corso è stato decisamente positivo con una percentuale del 92% di discenti che hanno ritenuto tale strumento Abbastanza e Molto utile al fine di verificare il proprio percorso di apprendimento. Si ricorda che i discenti acquisivano la facoltà di accesso al modulo successivo del corso solo previa verifica positiva del test di autovalutazione con una percentuale di risposte esatte almeno pari al 70%.

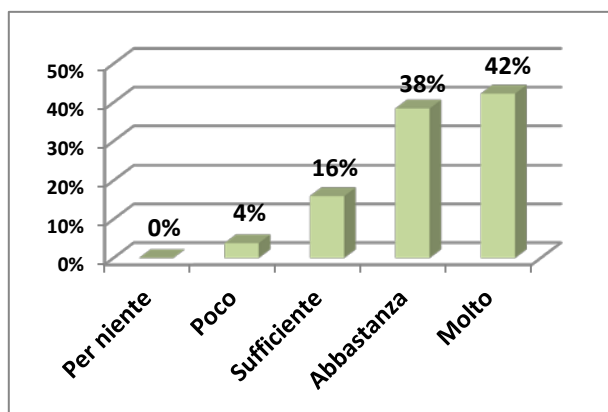


Figura 3 - I contenuti sono risultati coerenti con gli obiettivi?

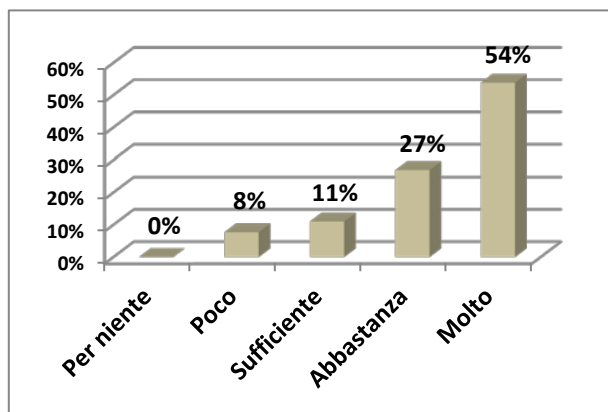


Figura 4 - Ritieni che le conoscenze acquisite ti saranno utili?

### **Conclusioni**

L'elaborazione delle osservazioni e dei commenti rilasciati dai partecipanti mostra un riscontro decisamente positivo non solo sulla struttura e sui contenuti del corso ma anche sulla modalità di erogazione. La formazione fornita quindi, da una parte conferma la validità della formazione a distanza come strumento di facile accesso e fruizione, dall'altra evidenzia l'interesse alla trattazione della certificazione BPL. Inoltre, sulla base delle valutazioni espresse, sono in corso di definizione miglioramenti sia in termini di programmazione della piattaforma, che consentiranno di ampliare il numero dei corsisti, che in termini di progettazione e rivalutazione dei contenuti che prevedono anche l'inserimento di schemi di progettazione, esempi di applicazioni ed ulteriori approfondimenti rispetto ad altri tipi di certificazione, il tutto senza appesantire la fruibilità complessiva dei contenuti stessi.

### **Bibliografia**

7. Direttiva 2004/9/CE del parlamento europeo e del consiglio dell'11 febbraio 2004 concernente l'ispezione e la verifica della buona pratica di laboratorio (BPL)
8. Direttiva 2004/10/CE "Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative all'applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche".
9. Regolamento (CE) n. 1907/2006 del PARLAMENTO europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE.
10. Decreto Legislativo 2 marzo 2007, n. 50 "Attuazione delle direttive 2004/9/CE e 2004/10/CE, concernenti l'ispezione e la verifica della buona pratica di laboratorio (BPL) e il ravvicinamento delle disposizioni legislative,

regolamentari ed amministrative relative all'applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche".

11. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring:1-15

# L'ATTIVITÀ DI ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ DEI DATI DEL SERVIZIO DI METROLOGIA AMBIENTALE: UN ESEMPIO DI PROVA ECOTOSSICOLOGICA INTERLABORATORIO

di A. Pati\*, S. Balzamo, S. Barbizzi, V. Bellaria, M. Belli, D. Conti, P. de Zorzi, T. Guagnini, C. Martone, A. Paina, V. Ubaldi

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma, Italy -  
alessandra.pati@isprambiente.it

---

**Abstract** -. Nella pubblicazione sono illustrati i risultati del confronto interlaboratorio ISPRA-IC020 "Valutazione ecotossicologica di contaminazione delle acque mediante saggi di tossicità acuta con *Vibrio fischeri*" organizzato dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'ISPRA per verificare la risposta dei laboratori afferenti al Sistema delle Agenzie ARPA/APPA su misure ecotossicologiche eseguite su materiali di prova. Le misure ecotossicologiche sono basate sulla determinazione dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio *Vibrio fischeri* dopo esposizione ad un tossico di riferimento (dicromato di potassio) e ad un tossico cieco distribuito come materiale di riferimento (ISPRA RMO34). I risultati del circuito hanno dimostrato una corretta applicazione del saggio ecotossicologico che ha quindi determinato un'ottima risposta in termini di dispersione dei risultati dei laboratori delle Agenzie Ambientali.

Parole chiave: Circuito di interconfronto, ecotossicologia, *Vibrio fischeri*

## *Introduzione*

Compito dell'ISPRA è quello di assicurare la comparabilità dei dati ambientali prodotti dai laboratori delle Agenzie Regionali Ambientali presenti sul territorio nazionale, attraverso l'armonizzazione dei metodi di misura e l'organizzazione di circuiti di interconfronto. Infatti, uno dei metodi definiti dalle norme tecniche internazionali per assicurare l'affidabilità e la comparabilità nel tempo dei dati prodotti dai diversi laboratori territoriali è l'esecuzione di circuiti di interconfronto, in cui vengono utilizzati materiali di riferimento. L'impiego di materiali di riferimento consente di valutare le prestazioni analitiche dei diversi laboratori e di individuare eventuali scostamenti tra i valori misurati e quelli di riferimento.

Il Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA organizza dal 2003 circuiti di interconfronto rivolti alle ARPA/APPA su tutte le matrici ambientali producendo, presso i Laboratori di Castel Romano, i materiali di riferimento da utilizzare per la valutazione delle procedure di analisi di tipo chimico. Queste includono il pretrattamento del campione e le tecniche analitiche utilizzate frequentemente nel monitoraggio e nel controllo ambientale, come la determinazione di metalli, di microinquinanti organici e dei parametri necessari al monitoraggio delle acque superficiali (ad esempio: cationi, anioni, pH, COD etc). A questi esercizi di interconfronto, negli ultimi anni, si affiancano i circuiti ecotossicologici che valutano le



prestazioni dei laboratori nell'esecuzione dei biosaggi su organismi, quali, ad esempio, *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* richiesti dalla normativa italiana.

Nel 2011 è stato organizzato un circuito d'interconfronto, ISPRA-ICO20, dal titolo "Valutazione ecotossicologica di contaminazione delle acque mediante saggi di tossicità acuta con *V. fischeri*".

Gli scopi del circuito erano: 1) valutare i risultati relativi alla determinazione dell'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio *V. fischeri* dopo esposizione ad un tossico di riferimento (dicromato di potassio) e ad un tossico cieco distribuito come materiale di riferimento ISPRA RMO34; 2) verificare la corretta applicazione del metodo di saggio valutando le singole prestazioni dei laboratori; ed infine 3) valutare il grado di dispersione dei risultati forniti dai laboratori impegnati in tale saggio.

I parametri richiesti, relativi alla prova definitiva del saggio di tossicità acuta con *V. fischeri*, sono stati i seguenti:

- valore di EC50 - 15 e 30 minuti con il tossico di riferimento dicromato di potassio
- valore di EC50 - 5, 15 e 30 minuti con il tossico cieco ISPRA RMO34\*

### **Materiali e metodi**

#### *Materiali di prova*

Ai laboratori sono stati distribuiti 2 materiali di prova per le misure ecotossicologiche:

- Materiale di Riferimento ISPRA RMO34 ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ ) tossico cieco;
- Dicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) tossico di riferimento.



Figura 1 (a) Tossico di riferimento - dicromato di potassio (b) Tossico cieco - ISPRA RMO34

#### *Tossico di riferimento*

Il tossico di riferimento per la prova ecotossicologica con *V. fischeri*, è costituito da dicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Il sale, circa 2 g (PANREAC, CAS 7778-50-9, EINECS 231-906-6), è stato fornito ai laboratori partecipanti in provette trasparenti in PP (volume 5 mL). Questo materiale è stato conservato a temperatura ambiente e al riparo dalla luce fino al momento dell'uso.

Tossico cieco - ISPRA RMO34

---

\*Autore di riferimento - A.Pati - Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma - Tel 0650073213-fax 065050519

Il tossico cieco per la prova ecotossicologica con *V. fischeri*, è costituito da cloruro di cadmio emipentaidrato [CdCl<sub>2</sub> · 2,5 H<sub>2</sub>O]. Il sale, circa 2 g (PANREAC, CAS 10108-64-2, EINECS 233-296-7), è stato fornito ai laboratori partecipanti in provette trasparenti in PP (volume 5 mL). Questo materiale è stato conservato a temperatura ambiente e al riparo dalla luce fino al momento dell'uso.

#### *Substrato biologico*

La determinazione dell'inibizione della bioluminescenza deve essere eseguita utilizzando ceppi NRRL B-11177 di batteri della specie *V. fischeri*, come sospensioni congelate da preparati commerciali, in accordo ai metodi APAT-IRSA 8030 e UNI EN ISO 11348-32.

Sono stati utilizzati da tutti i laboratori delle ARPA/APPa partecipanti al circuito ceppi batterici di *V. fischeri* liofilizzati e congelati sotto forma di Reagente Acuto Microtox, Ecotox LDS appartenente al lotto 11B1034 (sc. feb 2013). Era vincolante l'utilizzo del lotto di batteri n° 11B1034, fornito *ad hoc* da Ecotox per il circuito ISPRA IC020 affinché i risultati ottenuti dai laboratori fossero utilizzati nell'elaborazione statistica dei dati.

#### *Sistema di esecuzione del saggio*

Lo strumento per l'esecuzione del saggio è un fotometro termostato che può essere utilizzato per test acuti sia su matrici liquide che solide. Esistono due diversi sistemi per l'esecuzione del saggio: 1) Microtox (Ecotox LDS), 2) Lumistock (Dr. Lange). Il laboratorio del Servizio di Metrologia Ambientale ha utilizzato per una valutazione preliminare del valore di riferimento lo strumento Microtox® (Ecotox).

Per il circuito 6 laboratori delle ARPA/APPa hanno eseguito i saggi utilizzando lo strumento Lumistock® (Dr Lange), mentre i restanti 36 laboratori hanno utilizzato il Microtox® (Ecotox).

#### *Ulteriori informazioni richieste*

Per poter valutare la corretta applicazione del metodo di saggio da parte di tutti i laboratori sono state richieste ulteriori informazioni riguardanti:

- l'acquisto e/o la preparazione in laboratorio delle soluzioni utilizzate nel saggio (soluzioni diluente, di riattivazione e osmotica);
- l'esecuzione o meno del saggio preliminare (range-finding test) con il tossico cieco.

#### **Risultati**

La partecipazione al circuito è stata molto alta; infatti su 44 laboratori appartenenti a 18 ARPA/APPa che hanno inviato la Scheda di adesione per la partecipazione al CI, 42 laboratori, pari a circa il 95%, hanno restituito i risultati richiesti dal protocollo del circuito. Tali percentuali sono superiori ai valori riscontrati comunemente nei precedenti circuiti organizzati da ISPRA (85 %) su tematiche ecotossicologiche.

Le prestazioni dei laboratori sono state valutate rispetto ad un valore di riferimento assegnato per l'EC50 di consenso sulla base dei risultati dei laboratori partecipanti. In particolare, sono stati determinati i valori di consenso per :

- EC50-15 e 30 minuti, per il tossico di riferimento;
- EC50- 5, 15 e 30 minuti, per il tossico cieco

Tutti i valori di EC50, inviati dai laboratori, sono stati trasformati in logaritmo base 10. I valori di consenso sono stati ottenuti quale media robusta, anti-trasformata, dei valori logaritmici di EC50 (SOFTWARE AMC, ISO 13528:2005).

Al valore assegnato di consenso sono associati un limite inferiore e uno superiore di attenzione, pari, rispettivamente, al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto del circuito espressi in forma anti-trasformata dei valori

logaritmici (Environment Canada, 2005). Al calcolo del valore di consenso non hanno contribuito alcuni laboratori, i cui risultati sono stati ottenuti da misure eseguite senza che fossero completamente rispettate le condizioni di validità della prova con *V. fischeri*.

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportati il valore assegnati (anti-logaritmo e logaritmico) con i rispettivi limiti di attenzione e lo scarto tipo del circuito per il tossico di riferimento e il tossico cieco.

**Tabella 1** – Valori assegnati di riferimento EC<sub>50</sub> per il tossico di riferimento K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Parametro	Valore Assegnato	Limiti di attenzione		Scarto Tipo Robusto ISPRA-IC020	
		Superiore	Inferiore		
EC <sub>50</sub> -15 min	Anti-log (mg/L)	27,32	42,84	17,43	1,25
	Log <sub>10</sub>	1,44	1,63	1,24	0,10
EC <sub>50</sub> -30 min	Anti-log (mg/L)	16,28	22,67	11,70	1,18
	Log <sub>10</sub>	1,21	1,36	1,07	0,07

**Tabella 2** – Valori assegnati di riferimento EC<sub>50</sub> per il tossico cieco ISPRA RM034 (CdCl<sub>2</sub>·2,5 H<sub>2</sub>O)

Parametro	Valore Assegnato	Limiti di attenzione		Scarto Tipo Robusto ISPRA-IC020	
		Superiore	Inferiore		
EC <sub>50</sub> -5 min	Anti-log (mg/L)	78,97	191,47	32,57	1,56
	Log <sub>10</sub>	1,90	2,28	1,51	0,19
EC <sub>50</sub> -15 min	Anti-log (mg/L)	22,00	39,87	12,14	1,35
	Log <sub>10</sub>	1,34	1,60	1,07	0,13
EC <sub>50</sub> -30 min	Anti-log (mg/L)	8,60	16,16	4,58	1,37
	Log <sub>10</sub>	0,93	1,21	0,66	0,14

#### Valutazioni statistiche

Sono stati considerati validi i risultati derivanti da prove che, in base alla UNI EN ISO 11348-3, hanno soddisfatto le seguenti condizioni:

- un fattore di correzione (fkt) a 15 o 30 minuti compreso nell'intervallo 0,6 – 1,8;
- un valore di EC<sub>50</sub>-30 min per il tossico di riferimento pari a 18,71 ± 6,17mg L<sup>-1</sup> di Cr VI.

I laboratori con codice 10, 12 che non hanno rispettato suddetta condizione, sono stati esclusi dalle elaborazioni statistiche e dalla determinazione del valore di consenso per il tossico cieco. Tuttavia i loro risultati sono stati riportati graficamente insieme al complesso dei dati di tutti i laboratori.

Sull'insieme dei dati ritenuti validi per la valutazione statistica sono stati eseguiti i test di Shapiro – Wilk e Kolmogorov-Smirnov per la verifica di "normalità" della distribuzione dei valori medi di tutti i laboratori (S.P. Millard, et al., 2001).

Di seguito sono riportati in forma grafica i risultati del saggio con *V. fischeri* a 30 minuti eseguito dai laboratori sul tossico cieco ISPRA RM034 e sul tossico di riferimento suddivisi per metodo di misura. Le bande rosse rappresentano i limiti di

attenzione (2 volte lo scarto tipo robusto del circuito). Con \* si indicano i laboratori i cui risultati non hanno contribuito al calcolo del valore di consenso (Fig.2 e 3).

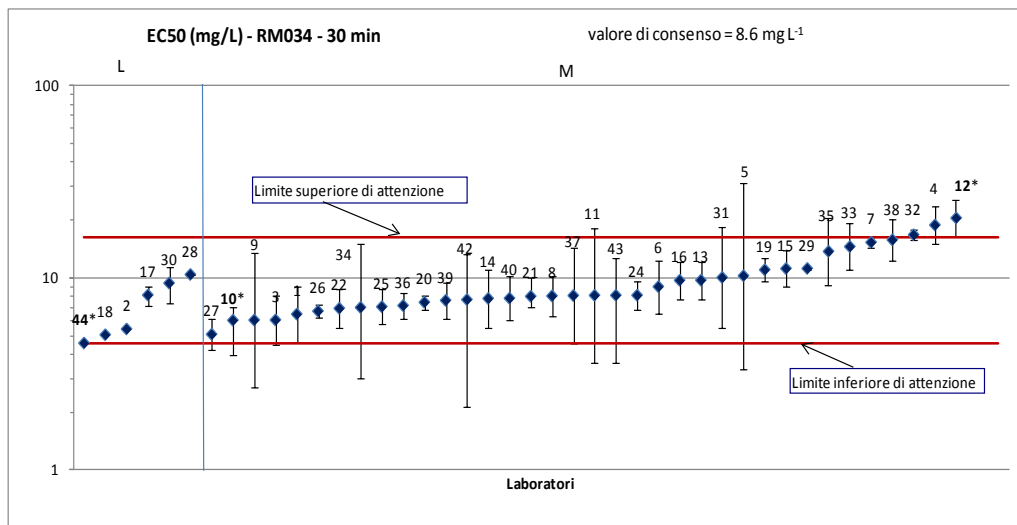


Figura 2 Risultati del saggio con *V.fischeri* eseguito sul tossico cieco (ISPRA RM034) a 30 minuti da tutti i laboratori partecipanti a ISPRA ICO20  
 Legenda: L (Lumistock®), M (Microtox®).

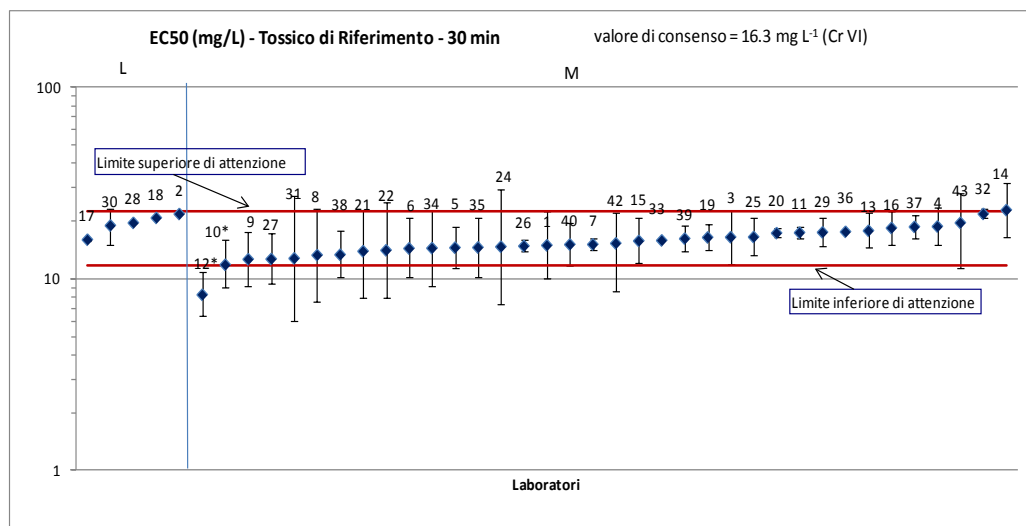


Figura 3 Risultati del saggio con *V.fischeri* eseguito sul tossico di riferimento (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) a 30 minuti da tutti i laboratori partecipanti a ISPRA ICO20  
 Legenda: L (Lumistock®), M (Microtox®).

### ***Conclusioni***

L'alta partecipazione dei laboratori all'interconfronto, accompagnata dall'elevato rapporto tra la percentuale di restituzione dei risultati e il numero di adesioni al circuito, segnala ancora una volta la necessità, avvertita dal sistema delle Agenzie, di prove valutative per i saggi di ecotossicità nell'ambito di un più ampio sistema di assicurazione di qualità comprendente verifiche esterne al laboratorio.

Si osserva una generale corretta applicazione del metodo di misura con la quasi totalità dei laboratori che rispettano i criteri di validità prescritti dal saggio con *V.fischeri*.

La corretta applicazione dei metodi si traduce in un'ottima risposta in termini di dispersione dei risultati dei laboratori: per tutti i misurandi si rilevano valori di CV% largamente inferiori al limite del 20% indicato come "preferibile" da Environment Canada (2005).

I risultati ottenuti dai laboratori hanno mostrato che la maggioranza di essi ricade all'interno dei limiti di attenzione (2 volte lo scarto tipo del circuito) indicando quindi una complessiva idoneità delle misure eseguite.

Con riferimento agli effetti potenziali indotti dall'uso o meno di soluzioni per il saggio preparate in laboratorio o reperite in commercio, i dati a disposizione non consentono alcuna considerazione conclusiva. Tale aspetto, che risulta qualitativamente apprezzato da alcuni laboratori, potrebbe meritare l'esecuzione di uno specifico studio collaborativo finalizzato a verificare l'impatto della preparazione delle soluzioni sulla determinazione della tossicità di composti chimici con il batterio *V. fischeri*.

### ***Bibliografia***

APAT IRSA Metodi analitici per le acque - Manuali e Linee Guida n.29/2003 - Metodo 8030 - Vol. terzo

Environment Canada EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments)  
"Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests

ISO 13528:2005 (E) "Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparisons".

Millard S. P., Neerchal N. K.; "Environmental Statistics with S-Plus", CRC Press, USA, 2001.

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

# AN EXAMPLE OF ROBUSTNESS EVALUATION DURING VALIDATION PROCESS OF AN ECOTOXICOLOGICAL ASSAY: LIMITS AND CRITICAL POINTS.

by V. Piazza <sup>a</sup>, M. Faimali <sup>a</sup>, M. Aragno <sup>b</sup>, R. Baudo <sup>c</sup>, T. Leoni <sup>d</sup>, D. Pellegrini <sup>e</sup>, S. Ziantoni <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Institute of Marine Sciences, National Research Council, Genova, Italy - veronica.piazza@ge.ismar.cnr.it, marco.faimali@ismar.cnr.it

<sup>b</sup> ARPA Piemonte, Cuneo, Italy - mario.aragno@arpa.piemonte.it

<sup>c</sup> CNR - ISE, Verbania, Italy - r.baudo@ise.cnr.it

<sup>d</sup> ARPA Marche, Macerata, Italy - tristiano.leoni@ambiente.marche.it

<sup>e</sup> ISPRA, Livorno, Italy - david.pellegrini@isprambiente.it

<sup>f</sup> ANGQ, Roma, Italy - stanislao.ziantoni@angq.it

---

**Abstract** -In order for data to be used for decision-making purposes it is essential that they are of known and documented quality. Verification and validation of data require that appropriate quality assurance and quality control procedures be followed, and that adequate documentation be included for all data generated. Laboratories have to validate non-standardized methods, or methods that have been developed within laboratory. For this purpose, a series of parameters (i.e. repeatability, reproducibility and robustness) are requested to be calculated to complete validation process. As regards ecotoxicological assays, laboratories validation requirements are established by UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005. Robustness of a method indicates how results are influenced by slight variations of parameters, and how such modifications can affect results. The aim of this study was to provide an example of robustness evaluation of an ecotoxicological assay, recently included into Italian legislation by UNICHIM (MU 2245:12 - *A. amphitrite* larval immobilization ), in order to check the limits within parameters can be changed and to point out limits and critical points of applying robustness evaluation in the field of ecotoxicology.

Keywords: validation; ecotoxicological assay; robustness

## *Introduction*

Requisites that have to be satisfied by an ecotoxicological assay to obtain validation are established by UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005. This type of assays presents some peculiarities that makes them different from chemical assays: the biological effect totally depends on the methodology applied. For this reason, different bioassays that evaluate toxicity by using different test organisms and methods, can obtain results with wide differences. Ecotoxicological assays can be therefore considered as empirical methods, and results have to be expressed as referred to the methodology. Ecotoxicological assays can be applied to environmental samples or to chemical toxicants, and show the effects (i.e. mortality, immobilization) on test organisms that have to be compared to the effects on the same organisms exposed, in the same

experimental conditions, to a negative control. In order to obtain validation of a method it is necessary to verify its robustness, that measures how a method can be influenced by variations of experimental parameters, that can modify final results. In this work, an example of how this step of a validation process can be applied to an ecotoxicological assay is presented; in particular a larval acute toxicity assay that uses II stage nauplii of the crustacean *Amphibalanus amphitrite* has been selected. This species is a good representative for saltwater crustaceans. The standardization of this bioassay has been first proposed by Greco et al. (2006) and its standardized protocol has recently been included into Italian legislation among approved laboratory bioassays [MU 2245:12]. The intra-and inter-laboratory precision of *A. amphitrite* naupliar toxicity test has been evaluated [Piazza et al., 2012], pointing out that the test can be conducted with a good degree of reproducibility, even among laboratories with varying levels of experience with the method. The main goal of this work was to provide an example of a first approach of an ecotoxicological assay to robustness evaluation, by following the UNICHIM guidelines for validation of analytical methods in chemical laboratories [179/O, 2011], pointing out possible problems presented by the approach proposed by guidelines. In this first step, only data regarding control have been considered, as the robustness of control represents a fundamental prerequisite. Once that critical parameters have been identified, it will be possible to repeat the evaluation using a reference toxicant.

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

Applied methodology is described in detail within UNICHIM standardized method protocol: MU 2245:12: Water Quality - Determination of naupliar mobility inhibition for *Amphibalanus* (= *Balanus*) *amphitrite* (Darwin, 1854) (Crustacea: Cirripedia) after 24 h and 48 h of exposition.

The experiment can be divided into two phases:

#### *Phase 1:*

First, the test was performed in standard conditions (see table 1), where parameters were fixed as indicated in the approved protocol (MU 2245:12); the test was performed by adding 20 nauplii II to 24-well polystyrene plates containing 2 mL of ASW. After 24 hours the number of immobile larvae was observed under a stereomicroscope. The number of immobile organisms is composed by the amount of dead larvae (considering dead those larvae that do not swim and do not move any appendages for 10 seconds of observation) and of "not-swimming" larvae (considering "not-swimming" those larvae that do not shift their barycentre but move their appendages). Eight repetitions of the test in such conditions were performed.

*Table 1. Standard experimental conditions for the acute toxicity tests conducted with II stage nauplii of Amphibalanus amphitrite*

Temperature	20±0.5°C
Salinity	35±2 ‰
pH	8
Number of larvae in test solution	20
Exposition time	24 h
Dilution water	Artificial Sea Water (Instant Ocean®)
Light conditions	Dark

### Phase 2:

In order to check the effect of different parameters, an experimental design was prepared as described in UNICHIM guidelines (179/0, 2011) where eight different combinations of the 7 parameters were considered (Youden and Steiner, 1975). For each parameter, a lower and an upper limit were considered, in particular: temperature [A=25°C; a= 15°C], salinity [B=20‰; b=40‰], pH [C=8,3; c=7,7]; number of larvae in test solution [D=15; d=25]; exposition time [E=22 hours; e= 26 hours]; dilution water [F= filtered natural sea water FNSW; f= artificial sea water ASW]; light conditions [G=light; g=dark] . Finally, 8 different results [s,t,u,v,w,x,y,z] were obtained ,each result corresponding to an immobilization percentage [see table 2].

*Table 2. Eight combinations of 7 parameters to check robustness of A. amphitrite naupliar acute toxicity test (Youden and Steiner, 1975).*

Parameters	Combinations							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperature [A/a]	A	A	A	A	a	a	a	a
Salinity [B/b]	B	B	b	b	B	B	b	b
pH [C/c]	C	c	C	c	C	c	C	c
N°larvae [D/d]	D	D	d	d	D	D	d	d
Exp.time [E/e]	E	e	E	e	E	e	E	e
Dil. Water [F/f]	F	f	F	f	F	f	F	f
Light cond. [G/g]	G	g	G	g	G	g	G	g
<b>Results</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

### Data analysis

Through statistic tools, the standard deviation [s.] was calculated for the 8 repetitions of the assay performed in standard conditions and a critical value [Vc] was calculated through a formula:

$$V_c = t_{p=0.95;v=7} * (s_r / \sqrt{2})$$

where  $t_{p=0.95;v=7}$  represents the t-test value for a confidential limit of 95% and 7 degrees of freedom, this value corresponds to 2,36.

Then, for each parameter, a limit value [V] was calculated through an algorithm that combines results [s,t,u,v,w,x,y,z] obtained in experimental conditions.

### Results

Immobilization percentages obtained for the eight repetitions of the assay performed in standard conditions are exposed in Table 3, the mean value and the standard deviation are reported too. The calculated  $V_c$  value corresponds to 4,09.

*Table 3. Immobilization percentages (after 24 h) of the 8 repetitions of the A. amphitrite naupliar acute toxicity test conducted in standard conditions. Mean value and Standard deviation are reported too.*

Test repetition	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean value	Std. Dev.
Immobilization %	0	4,3	0	0	2,8	4,3	5,9	0	<b>2,16</b>	<b>2,45</b>



In Table 4, immobilization percentages obtained with the eight different combinations of the 7 parameters are reported. Through these results, the limit value [V] for each parameter was calculated, and is reported in Table 5.

*Table 4. Immobilization percentages obtained by performing A. amphitrite naupliar acute toxicity test with eight different combinations of the 7 considered parameters.*

Parameters	Combinatio							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperature	25	25	25	25	15	15	15	15
Salinity‰	40	40	20	20	40	40	20	20
pH [C/c]	8.3	7.7	8.3	7.7	8.3	7.7	8.3	7.7
N°larvae	25	25	15	15	15	15	25	25
Exp.time	26	22	26	22	22	26	22	26
Dil. Water	FNSW	I.O.	I.O.	FNSW	FNSW	I.O.	I.O.	FNSW
Light cond.	light	dark	dark	light	dark	light	light	dark
%	0	0	12	0	0	0	10	0

*Table 5. Limit value [V] calculated for each considered parameter.*

Paramet	Temperatur	Salinity	p	N° larvae	Exposure	Dilution water	Light
Limit	0	5	5,	0	0	5	0

The acceptability criteria of a parameter foresees that its limit value [V] is lower than the critical value [Vc] obtained for the assay performed in standard conditions. If this criteria is satisfied ( $V < Vc$ ) the considered parameter is not to be considered critical, if  $V > Vc$  the parameter has to be considered as critical.

In the considered example, salinity, pH and dilution water resulted to be critical parameters.

### *Discussion*

First of all, it is important to underline that, in this example, data obtained do not follow a normal distribution, so the correct calculation procedure, reported in the UNICHIM guidelines, for the rightness of mean value obtained from the 8 combinations respect to the mean value obtained from the 8 repetitions in standard conditions cannot be followed, and the rightness of parameters cannot therefore be checked. The same considerations are valid for the ratio between the two variances. However, we have decided to go on and to check which of the considered parameters could be statistically significant in considering methodology robustness.

Applied experimental conditions allowed to calculate for each parameter, through the application of an algorithm that combines obtained results [s,t,u,v,w,x,y,z], a limit value [V]. In order to check if a parameter is critic or not, limit values have to be compared with the critical value [Vc] obtained for the test performed in standard conditions. In the reported example, three of the 7 considered parameters resulted to be critic: salinity, pH and dilution water. This means that, for these three parameters, fixed ranges within the parameter can vary were too large and, in these experimental conditions,

the method cannot be considered robust enough. Within a validation process of an assay, this type of result would suggest that the sensitivity of the test organism towards these parameters is high, and that a deviation from values reported in the standard protocol can have severe consequences on the final result of the test. As

explained in the introduction, aim of this work was to show an example of how the method for robustness evaluation proposed by validation protocols could be also applied in the process of validation of an ecotoxicological bioassay, and to point out possible limits or criticalities. In general, guidelines for validation of methods usually refer to chemical methods, and robustness is one of suggested parameters to be evaluated. We can therefore hold this parameter important also for ecotoxicological assays.

The proposed method for robustness evaluation, normally used for analytical methods, in this work was applied to a larval toxicity assay; for this reason results obtained have not to be considered as final, but they just represent a first approach to this validation process. Indeed, an ecotoxicity test, that makes use of living organisms as a tool to observe and to evaluate an effect, normally presents a higher variability in results respect to chemical or microbiological tests. Reducing bioassay variability by identifying sources of variation and controlling key parameters is of fundamental importance in the field of ecotoxicology, and an approach like the one showed in this work is very useful, as it suggests which are the parameters that have to be taken into account in order to minimize the possibility of variation in results not caused by the tested samples but by test parameters.

Results obtained in this first approach point out which of the parameters involved in the bioassay could significantly influence the final result, but cannot be considered as definitive and lead us to consider this larval assay as not responding to robustness requisites foreseen in a validation process. These preliminary findings are useful as an indication of how the ranges of variability of these three parameters have to be modified. Therefore, it is strongly suggested to repeat this experiment by using closer ranges for salinity and pH. As regards the third parameter, the dilution water, of course it is not possible to modify the range, as in this case there are only two conditions that are possible (Artificial Sea Water or Filtered Natural Sea Water), further considerations about the criticality of this parameter have to be put off until a new experiment will be performed.

### ***Conclusions***

This first application of the robustness method evaluation proposed by UNICHIM guidelines to the naupliar acute toxicity assay with *A. amphitrite* pointed out three parameters that, in the applied experimental conditions, have shown to be critic. It is necessary to repeat the experiment by reducing the ranges of variability for these parameters. The criticalities showed during this approach are referable to the normal variability of ecotoxicological assays respect to chemical tests, and underline that a greater attention has to be paid dealing with these bioassays.

### ***Acknowledgements***

The authors would like to thank Dr. Nicola Bottazzini and Dr. Claudio Divo of UNICHIM (Milano, Italy) for their help in conducting experimental design for robustness evaluation.

### ***References***

Greco G, Corrà C, Garaventa F, Chelossi E, Faimali M 2006. Standardization of laboratory bioassay with *Balanus amphitrite* larvae for preliminary oil dispersants toxicological characterization. *Chem Ecol* 22 [Suppl.]: 163-172.

M.U. 2245:12 Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di naupli di Amphibalanus (= Balanus) amphitrite (Darwin, 1854) (Crustacea: Cirripedia) dopo 24 h e 48 h di esposizione.

Piazza V, Ferioli A, Giacco E, Melchiorre N, Valenti A, Del Prete F, Biandolino F, Dentone L, Frisenda P, Faimali M. 2012. A standardization of Amphibalanus (Balanus) amphitrite (Crustacea, Cirripedia) larval bioassay for ecotoxicological studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 79: 134-138.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

UNICHIM 179/O : 2011 Guidelines for validation of analytical methods in chemical laboratories.

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

## SESSIONE B: ARGOMENTI EMERGENTI IN ECOTOSSICOLOGIA: DAI NANOMATERIALI ALLA TOSSICOGENOMICA

*di Giovanni Libralato e Valeria Matranga*

---

Nell'ambito di questa sessione, caratterizzata da 6 comunicazioni orali e 6 posters, sono state affrontate le tematiche di punta in ecotossicologia con particolare riferimento ai nanomateriali ingegnerizzati. Le presentazioni hanno riguardato l'analisi dei possibili effetti di varie tipologie/categorie di nanomateriali ingegnerizzati (nTiO<sub>2</sub>, QDs, nZnO, nanoHorn e nano Carbon Black) presi singolarmente, ma anche in associazione ad altri inquinanti tradizionali (Cd, e diossina), rispetto ad un ampio intervallo di endpoint relativi a numerose specie indicatrici appartenenti a vari livelli trofici (micro-alghe, cnidari, policheti, molluschi bivalvi, crostacei, ricci di mare, pesci). E' stata evidenziata la necessità di approfondire specialmente il trinomio caratterizzazione dei nanomateriali - modalità di esposizione in situ (ambienti marini) - analisi degli effetti biologici. Un altro aspetto emerso con preponderanza è il fatto che molte delle attività di ricerca effettuate sono state condotte con un finanziamento dedicato ridotto o addirittura assente, ma soprattutto con molta disponibilità e spirito di sacrificio da parte dei ricercatori coinvolti. A questo proposito, al termine della sessione è stato dato l'annuncio della costituzione, in seno alla Società Italiana di NanoTossicologia (SIN), del Gruppo di Lavoro a livello nazionale in "Nano-Ecotossicologia Marina". Il GdL è nato con lo scopo di creare un'aggregazione tra ricercatori appartenenti a varie Università, Enti di Ricerca, Enti Locali ed Imprese, interessati alla tematica, con l'obiettivo di costituire una rete organizzata di collaborazione fattiva, anche di tipo progettuale. Al momento sono state raccolte già circa trenta adesioni, destinate ad aumentare con i prossimi appuntamenti scientifici. (Una prima riunione degli aderenti al GdL è stata effettuata successivamente alle giornate in coincidenza al 1st Marine NanoEcotox Workshop a Palermo il 29 Novembre 2012). Da questa iniziativa è emerso che risulta essere di estrema importanza la redazione come Gruppo di Lavoro a livello nazionale in "Nano-Ecotossicologia Marina" di un "Position paper" della nostra comunità scientifica allargata per chiedere un incontro con il Ministero e discutere le strategie future che il paese deve sviluppare su questo argomento emergente. Dovremo spendere anche in ambito nazionale gli sforzi che già stiamo facendo in ambito internazionale (es. Nano Safety cluster). Se vogliamo in futuro attenzione anche economica per questa tematica dobbiamo far sapere che ci siamo, siamo organizzati e già proiettati verso l'Europa.

# MARINE NANOECOTOXICOLOGY: MOLECULAR APPROACHES AND MODEL ORGANISMS

*by V. Matranga*

CNR, Institute of Biomedicine and Molecular Immunology "A. Monroy", Palermo, Italy  
- valeria.matranga@ibim.cnr.it

---

Most recently there is a growing concern on the use of nanomaterials which are employed in many modern industrial products coming from diverse fields, such as electronics, biomedicine, agriculture, manufacturing, pharmaceuticals and cosmetics. As a consequence, in the last two decades the international community has given much attention to the safety of workers coming in contact with engineered nanoparticles (ENPs) produced and/or utilized in such industries (Handy et al 2008). On the contrary, little attention has been given to the safeguard of ecosystems, and especially to organisms living in potentially ENPs-contaminated waters. Thus, to be aware of the potential ecotoxicological impact of ENPs endangering the aquatic matrices, including sea waters, has become increasingly important (Fabrega et al 2011). However, although the ENPs contained in the industrial products end up in waterways and reach the sea, most of the available toxicological reports on the noxious effects of ENPs are limited to species living in freshwaters. This is partially due to the fact that very scant studies are available on the fate and behaviour of ENPs in sea water, that very much depend on ENPs physical-chemical properties in such a milieu. Studies are awaited in this direction.

It should be taken into consideration that the three main sources of ENPs released in the marine ecosystems are: i) personal care products, such as cosmetics and sunscreens, including ZnO and TiO<sub>2</sub> NPs, ii) sewage, and ENPs trapped in waste water sludge, iii) anti-fouling treatments, i. e. paints designed to prevent the attachment and growth of aquatic organisms. Careful and rigorous studies are needed at different organizational levels using ENPs that compose these different products. It is very possible that the inconsistency in the reported effects of ENPs on different aquatic/marine organisms might relay not only on the various ENPs used for exposure but also on the different physiology of the organisms evaluated in the study. Hence, it should be taken into consideration that the biological ENPs targets identifiable in the marine environment belong to at least three major categories: i) filter feeders, which can be exposed to high ENPs concentrations present in surface waters after deliberate or accidental release from terrestrial and atmospheric sources; ii) pelagic species, ranging from phytoplankton to fish and mammals, including deep sea species exposed to ENPs during vertical migration of the particles; and iii) benthic species, that are probably feeding on ENPs deposited in sediment biofilms, and could be also exposed to ENPs via epidermal uptake. The route ENPs take to enter the organisms, greatly affects their subsequent tissue localization and organ retention, as well as the overall toxicity. Unfortunately, also in this case the current literature is not complete, further studies are needed to investigate how ENPs are taken up and ingested by marine organisms. To this purpose, marine organisms, including their embryonic or larval forms, should be selected for their suitability and proposed as part of a battery of animal models to be used in risk assessment studies (Canesi et al, 2012; Falugi et al 2012; Matranga and Corsi

2012). Last, with the expansion of the genomic era to the field of marine ecotoxicology, the term ecotoxicogenomics was launched years ago to describe the integration of genomics, including transcriptomics, proteomics and metabolomics, into Ecotoxicology (Snape et al., 2004). As new techniques have provided valuable tools for monitoring pollution in general (Steinberg et al., 2008), it is expected that the mutual integration of environmental sciences and molecular biology will enable the identification of interactions between ENPs and whole organism cell responses. In conclusion, a close collaboration between ecotoxicologists, analytical chemists and molecular biologists, with industry and endpoint users will provide the overall risk assessment picture, assisting decision makers in the estimation of ENPs environmental nanosafety.

This report will provide an overview on the above summarized topics, with a particular focus on molecular approaches and model organisms, aimed at future developments in the area of marine nano ecotoxicology.

### ***References***

Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., Jun 28 2011. Bivalve molluscs as an unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research* 76: 16-21.

Fabrega, J., Luoma, S.M., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R., 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environmental International* 37: 517-531

Falugi, C., Aluigi, M.G., Chiantore, M.C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M.A., Fabrizi, A., Pinsino, A., Matranga, V., Nov 3 2011. Toxicity of metal oxide nano-particles in immune cells of the sea urchin. *Marine Environmental Research* 76: 114-121.

Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E., 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17: 315-325.

Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67: 143-154.

Steinberg, C.E., Stürzenbaum, S.R., Menzel, R., 2008. Genes and environment: striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Science of the Total Environment* 400: 142-161.

# TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES AND ABC TRANSPORTERS IN MARINE MUSSELS: TROJAN HORSE EFFECT WITH CADMIUM AND DIOXIN?

by I. Corsi\*, C. Della Torre and S. Focardi

Dipartimento di Scienze Fisiche della Terra e Ambientali, Università degli Studi di Siena, via Mattioli 4, 53100, Siena, Italy- [ilaria.corsi@unisi.it](mailto:ilaria.corsi@unisi.it)

---

**Abstract** -. The goal of the present study was to investigate the interaction of titanium dioxide nanoparticles (n-TiO<sub>2</sub>) with the ATP binding cassette transport protein P-glycoprotein (P-gp) in the gills of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* as part of possible defense mechanism against NPs exposure in sea water. n-TiO<sub>2</sub> interaction with the P-gp at gene level (ABCB1) and efflux activity has been studied both in vitro (2h) and in vivo (96h) in gills of mussels exposed to n-TiO<sub>2</sub> (0.1-1 mg/L) and also combined with cadmium (0.1 mg/L) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd) (0.25 ug/L) in order to investigate a possible Trojan horse effect. A similar behaviour of n-TiO<sub>2</sub> at gene and efflux activity levels was observed in gill biopsies exposed in vitro with a slight significant increase in ABCB1 gene expression and a decrease in RhB accumulation. Co-exposure with Cd caused a more marked ABCB1 gene expression compared to single chemicals exposure suggesting an additive effect. In vivo exposure caused again a significant increase of ABCB1 gene expression for n-TiO<sub>2</sub> (2-2.5 fold vs controls). ABCB1 and P-gp may act as defense mechanism towards n-TiO<sub>2</sub> exposure in short term exposure condition while more complex and specific mechanisms might be activated in longer time. The absence of a Trojan horse effect of n-TiO<sub>2</sub> towards Cd and 2,3,7,8-tcdd might be thus hypothesized.

Keywords: TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Mytilus*, ABC transporter, Cd, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

## Introduction

The Multidrug resistance (MDR) known also as Multixenobiotic Resistance (MXR) is a part of the detoxification mechanism based on trans-membrane transport proteins belonging to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, which actively pump a broad spectrum of chemicals including "xenobiotics" out of the cell [Kurelec, 1992; Epel, 1998; Leslie et al., 2005] preventing intracellular accumulation and potential toxic effects. The main representative of MDR/MXR-related ABC transporters is P-glycoprotein (P-gp/ABCB1) which act as a cellular first line of defense by preventing up-take of compounds by the cell (phase O of cellular detoxification) [Leslie et al., 2005]. MDR like ABC transporters have been found in all taxa from bacteria, fungi, plants, invertebrates and vertebrates including a wide variety of aquatic organisms such as sponges, mussels, oysters, clams, worms and fish [Bard, 2000; Zucchi et al., 2010] where the transporters confer resistance to environmental toxicants. Among the most abundant and almost unknown environmental contaminants in terms of impact on the marine environment, nanomaterials (NM) are among the most emerging and interesting to be studied. Their wide and increasing application in numerous fields inevitably released them into the soil and waterways and eventually

reach the ocean [Matranga and Corsi, 2012]. In particular, the UV blocker nanoparticles (NPs) used in sunscreens as well as in antifouling paints and in many other sectors from which they reach the marine environment, appear as the NM category with the highest priority for future studies in the marine environment. Titanium dioxide (n-TiO<sub>2</sub>) used in sunscreens and several other applications for over 20 years, well before the recent concern with the nanotechnology risk assessment is the most representative and of most concern. In terms of NPs uptake into biological systems it appears to be facilitated by the caveolar and endocytotic systems in cells, but there is very limited knowledge regarding the involvement of defense systems as ABC transport proteins [Moore, 2006]. Recent findings on encapsulated cancer drugs show that the administration of engineered nanoparticles (ENPs) can reverse P-gp [Dong et al., 2009; Chen et al., 2008; Lu et al., 2007] and Salomon and Ehrardt [2011] suggest that NPs can attenuate P-gp membrane transporter function depending on the size and surface properties and might influence the disposition of xenobiotics as well as endogenous substrates. Thus potential role of TiO<sub>2</sub> NPs in reversing P-gp and other important efflux transporters to increase the cellular accumulation of toxic compounds needs to be more clearly elucidated in marine organisms. The interactions between NPs and other marine pollutants are complex and could alter the amount of contaminants accumulated and either amplify or ameliorate their toxicities known as *Trojan horse mechanism* [Hartmann and Baun, 2010].

Among potential biological targets in the marine environment, filter feeders as bivalve molluscs can be exposed to high NPs concentration present in surface waters released by terrestrial and atmospheric sources or existing aggregates [Matranga and Corsi, 2012]. As classical marine model organisms, they have been only recently investigated in terms of bioavailability and toxicity of NP in marine environment based on the importance on invertebrates as sensitive and target organisms. In particular, the mussel *Mytilus* spp., abundant in coastal marine and estuarine environments, can represent a suitable model organism for characterizing potential impact of NPs. In *Mytilus*, food particles are trapped by the gill which could represent a first barrier of defense from NPs exposure. ABCB-type transporter conferring environment-tissue barrier in bivalve gills have been already reported in our previous studies in *Mytilus* spp. genus [Luckenbach et al. 2004] and later deeply investigated by Luckenbach and Epel [2008]. The aim of the present study was to investigate the interaction of n-TiO<sub>2</sub> with P-gp at both gene (ABCB1) and efflux activity level in gills of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and how this might affect potential accumulation and/or toxicity of toxic compounds such as cadmium and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

## **Methods**

### *Experimental animals*

Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819), 5-6 cm mean valve length were collected from an unpolluted areas in Sardinia and kept in 18°C artificial seawater (36 ‰ salinity) prepared following ASTM protocol E 724-98 [ASTM, 2004], and not fed during exposure.

### *Preparation and characterization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles*

Aeroxide P25 (Nanosized Titanium Dioxide, 99.9% purity) kindly provided from Eigenmann & Veronelli were used for preparing stock suspensions at conc. 10ug/ml in artificial sea water [ASTM 2004] and sonicated for 45 min. at 100 W. HR-TEM was used to determine the mean average size of primary and secondary particles in ASW. The adsorption of Cd onto n-TiO<sub>2</sub> was tested using the adsorption isotherm by varying the initial Cd concentration at fixed n-TiO<sub>2</sub> concentration. After some hours



the residual Cd concentration in aqueous phase was measured and calibrated vs control solutions without n-TiO<sub>2</sub>. DLS analysis was performed with a Submicron Particle sizer Nicomp 380. ICP-MS was used for detecting potential impurities. BET was used for surface area determination using a Micromeritics ASAP 2000.

### *Experimental design*

Mussel's punch biopsies from gill tissue (6 mm diameter) obtained using Acu Punch biopsy (Acuderm) were *in vitro* exposed for 2 hours to the following concentrations of n-TiO<sub>2</sub>, cadmium and 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin single and in combination: n-TiO<sub>2</sub> 1 mg/L, Cd 0.1 mg/L, 2,3,7,8-tcdd 0.25 µg/L.

Whole mussels were exposed for 96h to the following concentrations of the same chemicals: n-TiO<sub>2</sub> 0.1mg/L, Cd 0.1 mg/L, 2,3,7,8-tcdd 0.25 µg/L. After *in vivo* exposure gills were excised from mussels and biopsy punches were obtained with the same procedure used for *in vitro* exposure.

### *Efflux transporter assay*

Both *in vitro* exposed gill punches and those obtained from *in vivo* exposed whole mussels were used for competitive binding assay using rhodamine B (RhB) as fluorescent dye and substrate of P-gp according to the method of Neyfakh et al. (1988). Inhibition of the transporter by a test compound results in increased fluorescence due to greater accumulation of RhB within the cell. Transporter activity assays were performed according to the procedure by Luckenbach and Epel (2008) with some modifications. Incubations of gill punches were performed in polystyrene dishes in a volume of 15 ml of ASW plus RhB 1µM for 90 min in the dark with gentle shaking. Verapamil 10µM has been used as positive control as potent inhibitor of P-gp efflux activity. For RhB quantification the method of Luckenbach and Epel (2005) was used. ANOVA and Dunnett's test were applied to determine statistical differences between groups and regarded as significant if p< 0.05.

### *RNA extraction and qRT-PCR analysis*

For the purpose of the expression quantification of ABCB1 gene encoding for P-gp, total RNA was isolated from gill punch biopsies using TriReagent (Sigma) following the manufacturer's protocol and including a DNase treatment (Ambion) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using a Traycell spectrophotometer (Eppendorf) at 260 nM. cDNA for RT-PCR was generated from 0.25 µg total RNA from all samples in 20 µl reaction volume using iScript cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's protocol (Biorad, USA). Specific primers for Abcb1 here and the housekeeping Elongation Factor  $\alpha$  were designed for q-PCR using IDTDNA [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). Q-PCR was performed in Stratagene 3000xP thermal cycler. Each amplification reaction contained 12.5 µl SYBR® Green (Biorad), 1 µl of Forward and Reverse primers 10 µM and 1 µl cDNA in 25 µl total volume. The cycling parameters were: 3 min denaturation at 95°C, 40 cycles at 95°C for 44 s, annealing at 55°C for 60 s, elongation at 72°C for 45 sec. Data were analysed by the  $\Delta\Delta C_t$  method according to the method of Pfaffl et al. (2001). Expression of target genes was normalized to expression of the housekeeping gene as 18s. Data are presented as fold increase in expression of the target gene in gills *in vitro* and those from whole mussels *in vivo* exposed compared to controls (gene expression in non-exposed punch or whole mussels).

## **Results**

### *n-TiO<sub>2</sub> characterization*

Primary and secondary characterization in ASW of Aeroxide © (n-TiO<sub>2</sub>) revealed a mean average size of primary particles by HR-TEM of 27 nm (range 15-47 nm for

90% of particles analyzed). Surface area by BET analysis was 54 m<sup>2</sup>/g, DLS analysis revealed stable agglomerate of 900 nm in ASW and ICP-MS showed impurities of Mg (323 µg/g) and Na (24 µg/g).

#### *Efflux transporter assay and *abcb1* gene expression*

In the *in vitro* exposed punch gill's biopsies, n-TiO<sub>2</sub> (1 mg/L) significantly decrease the accumulation of RhB compared to controls (ASW) and verapamil (10 µM) exposed groups. Similar trend is observed for Cd (0.1 mg/L) but to a lesser extent than n-TiO<sub>2</sub> (p<0.05). Co-exposure of n-TiO<sub>2</sub> with Cd resemble what observed for single n-TiO<sub>2</sub> exposure with a significant decrease in the accumulation of RhB inside the cells (p<0.05). Regarding 2,3,7,8-tcdd exposed gill's biopsies, a significant increase in RhB accumulation is observed compared to controls and n-TiO<sub>2</sub> and Cd exposed punches (p<0.05). At gene level, n-TiO<sub>2</sub> caused a slight significant increase in ABCB1 gene expression compared to controls (p<0.05); co-exposure with Cd caused a more marked increase of ABCB1 gene expression compared to single chemicals exposure (p<0.05). Gill biopsies from *in vivo* exposed mussels showed a less marked decrease in RhB accumulation both in n-TiO<sub>2</sub> and Cd exposed mussels compared to controls (p<0.05), while 2,3,7,8-tcdd showed a significant decrease in the accumulation of RhB both in single and co-exposure with n-TiO<sub>2</sub>, contrarily of what observed *in vitro*. At gene level, *in vivo* exposure caused again a significant increase of ABCB1 gene expression in n-TiO<sub>2</sub> exposed mussels (2-2.5 fold vs controls) (p<0.05) while co-exposure with Cd and 2,3,7,8-tcdd seemed not altering ABCB1 gene expression compared to controls.

#### *Discussion*

A similar behaviour of n-TiO<sub>2</sub> at gene and efflux activity levels is observed in gill biopsies exposed both *in vitro* (2h) and *in vivo* (96h) with a significant increase in ABCB1 gene expression and a decrease in RhB accumulation. A lesser accumulation of RhB in exposed punch biopsies compared to controls is considered indicative of an higher P-gp efflux activity which might be related to a specific role of n-TiO<sub>2</sub> (Luckenbach and Epel, 2008). Independent efflux P-gp assays (data not shown) testing n-TiO<sub>2</sub> in co-incubation with the P-gp substrate RhB showed that no alteration of efflux activity is observed compared to controls. A substrate role of n-TiO<sub>2</sub> can be thus excluded based also on the effect on ABCB1 gene expression. Taken together both data at gene and efflux levels, suggest a chemosensitizer role for n-TiO<sub>2</sub>, with a potential protective role of ABCB1/P-gp as it has been also already hypothesized for Cd which also showed a similar behaviour. Preliminary considerations based on the set of data currently available seem to suggest that P-gp might act as a defense mechanism towards n-TiO<sub>2</sub> in short-term exposure conditions while more complex and specific mechanisms might be activated in longer exposure time. The absence of a Trojan horse effect of n-TiO<sub>2</sub> towards Cd and 2,3,7,8-tcdd can be thus hypothesized.

#### *Acknowledgements*

This work is supported by MIUR PRIN 2009. Marine ecotoxicology of manufactured nanomaterials. Biological effects and bioaccumulation of combined exposure to nano-TiO<sub>2</sub>, metals and dioxin on edible species.

#### *References*

ASTM International (2004) Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs E724-98.  
Bard S.M. (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, vol. 48: 357-389.

Chen B., Sun Q., Wang X., Gao F., Dai Y., Yin Y., Ding J., Gao C., Cheng J., Li J., Sun X., Chen N., Xu W., Shen H., Liu D. (2008) Reversal in multidrug resistance by magnetic nanoparticle of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> loaded with adriamycin and tetranidrine in K562/A02 leukemic cells. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 3: 277-286.

Dong X., Mattingly C.A., Tseng M.T., Cho M.J., Liu Y., Adams V.R., Mumper R.J. (2009) Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. *Cancer Research*, vol. 69: 3918-3926.

Epel D. (1998) Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, vol. 2: 120-123.

Goldstone J.V., A. Hamdoun, B.J. Cole, M. Howard-Ashby, D.W. Nebert, M. Scally, M. Dean, D. Epel, M.E. Hahn, J.J. Stegeman (2006) The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Developmental Biology*, vol. 300: 366-384.

Hartmann N.B., Baun A. (2010) The nano cocktail: ecotoxicological effects of engineered nanoparticles in chemical mixtures. *Integrative Environmental Assessment Management*, vol. 6: 311-314.

Kurelec B. (1992) The multixenobiotic resistance mechanisms in aquatic organisms. *Critical Reviews on Toxicology*, vol. 22: 23-43.

Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 204: 216-237.

Lu J., Monty L., Zink J.I., Tamanoi F., 2007. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small*, vol. 3: 1341-1346

Luckenbach T., Epel D. (2008) ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *American Journal Physiology and Regulatory Integrative Comparative Physiology*, vol. 294: 1919-1929.

Luckenbach T., Corsi I., Epel D. (2004) Fatal odors: synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense mechanisms in mussels. *Marine Environmental Research*, vol. 58: 215-219.

Matranga V. and Corsi I. (2012) Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*, vol. 76: 32-40.

Moore M.N. (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, vol. 32: 967-976

Neyfakh A. A. (1998) Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exposure Cell Research*, vol. 174: 168-176.

Pfaffl M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, vol. 29: 2002-2007.

Salomon J.J., Ehrardt C. (2011) Nanoparticles attenuate P-glycoprotein/MDR1 function in A549 human alveolar epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 77: 392-397.

Smital T., T. Luckenbach, R. Sauerborn, A. Hamdoun, R. Vega, D. Epel (2004) Emerging contaminants – PPCPs, pesticides and microbial degradation products as inhibitors of the multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research*, vol. 552: 101-117.

Zucchi S., Corsi I., Luckenbach T., Bard S.M., Regoli F., Focardi S. (2010) Identification of five partial ABC-transporter genes in the liver of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*: sensitivity of ABCB1 and ABCC2 to Cd. *Environmental Pollution*, vol. 158: 2746-2756.

# IN VITRO AND IN VIVO GENOTOXICITY EVALUATION OF TiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES IN MARINE ORGANISMS

by M.Nigro<sup>a</sup> \*, V. Stingò<sup>b</sup>, I.V.Valentino<sup>b</sup>, M. Bernardeschi<sup>b</sup>, P.Guidi<sup>b</sup>, V. Scarcelli<sup>b</sup>, G.Frenzilli<sup>b</sup> and L.Rocco<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa, via Volta 4, 56126, Pisa

<sup>b</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Napoli II, Caserta - marco.nigro@med.unipi.it

---

**Abstract** -. The production of titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NPs) is leading to its increasing presence in receiving water bodies. The aim of this study was to investigate the genotoxic potential of TiO<sub>2</sub>-NPs in *Mytilus galloprovincialis* and in *Dicentrarchus labrax* both in vitro and in vivo. Genotoxicity was also investigated by the co-exposure of TiO<sub>2</sub>-NPs with Cadmium and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin. Comet assay and RAPD-PCR assay were used. TiO<sub>2</sub>-NPs resulted to reduce genome stability both in vitro and in vivo. Comet assay showed an induction of DNA strand breaks in mussel gill cells treated in vitro. An effect of Cd and dioxin both in vitro and in vivo was observed with Comet assay and RAPD..

Keywords: DNA damage, titanium dioxide, nanoparticles, Comet assay, RAPD-PCR

## *Introduction*

Manufactured titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NPs) are the most widely used NPs [two million tons per year], whose applications range from sunscreens, cosmetics, vitamins to construction materials [Jonhston et al., 2009]. Exposure modeling studies coupled with experimental evidences revealed that TiO<sub>2</sub>-NPs will likely occur in natural surface waters in significant concentrations [few micrograms per liter] potentially leading to biological effects [Nowack et al., 2008; Kaegi et al., 2008; Gottschalk et al., 2009]. Moreover, these particles have the potential to impact organisms directly through their inherent properties, but also indirectly as vehicle for other natural and man-made pollutants [Trojan-horse effect] [Navageni et al., 2004; Nowack et al., 2007; Baun et al., 2008]. The effective adsorption of organic contaminants on TiO<sub>2</sub>-NPs may significantly increase the in vivo exposure level of these compounds when they are present together with TiO<sub>2</sub>-NPs in the environment [Oliva et al., 2003]. Recent findings on in vitro studies with human hepatocytes revealed that co-exposure to TiO<sub>2</sub>-NPs and p,p'DDT synergistically enhanced genotoxicity via increasing oxidative DNA damage [Shi et al., 2010]. As well as for lipophylic contaminants, peculiar properties of NPs, such as a large specific surface area, small size, high porosities, surface charge, crystalline structure, catalytic activity may facilitate the transport of toxic metals in the environment [Pena et al., 2006]. The available experimental data suggest that NPs have the potential to impact organisms directly through their inherent properties and also indirectly as a vehicle of toxic metals. It has been reported that when cadmium and arsenate [As (VI)] are

dosed in combination with n-TiO<sub>2</sub> their bioaccumulation by the carp in significantly increased due to the carrying effect of n-TiO<sub>2</sub> (Sun et al., 2007; Zhang et al., 2007). It is well known that TiO<sub>2</sub>-NPs are responsible for photo-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage. This appears as ironic considering that TiO<sub>2</sub>-NPs, used in sunscreens for protecting the skin from ultraviolet radiation (UV), also induce ROS able to cause oxidative damages to cell components (Reeves et al., 2008; Vevers and Jha, 2008). Adverse effects, including DNA strand breaks, chromosomal damages and elevated induction of apoptosis, has been reported after exposure to TiO<sub>2</sub> alone in mammalian cell lines (Rahman et al. 2002; Kang et al., 2008). Otherwise, Vevers and Jha (2008) did not find any enhancement of DNA strand breaks in trout cells exposed to n-TiO<sub>2</sub> alone, but reported a significant elevation of formamidopyrimidine DNA glycosylase sensitive sites, denoting the presence of oxidized purine. Although the marine environment is the final receptacle of most pollutants, data regarding the toxic potential of TiO<sub>2</sub>-NPs for marine species is largely unknown (Matranga and Corsi, 2012). In the present study the genotoxic effect of TiO<sub>2</sub>-NPs alone and in combination with two toxic substances such as Cadmium (Cd) and 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) were investigated *in vitro* and *in vivo* in two marine model species: the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*).

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

Nanosized Titanium Dioxide (P25) was provided from Degussa Evonik (Essen, Germany). Stock suspensions were freshly prepared in ASW at 100 µg/ml and then sonicated for 15 minutes before use.

For the *in vitro* exposure primary cultures of mussel gill cells and sea bass DLEC were treated with n-TiO<sub>2</sub> alone and in combination with Cd and TCDD (dissolved in DMSO 0.01%). Mussel cells were exposed for 90 min to TiO<sub>2</sub> 10 µg/ml, Cd 0.1 mg/L and TCDD at 0.001 mg/L. *Dicentrarchus labrax* embryonic cells (DLEC) were treated for 24 hrs with n-TiO<sub>2</sub> (1 µg/ml) alone and coupled with Cd (0.1 µg/ml).

For the *in vivo* exposure, mussels were exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs alone and in combination with Cd and with TCDD for 4 days at the following doses: TiO<sub>2</sub>-NPs 0.1 mg/L; Cd 0.1 mg/L; TCDD at 0.001 mg/L.

### ***Genotoxicity evaluation***

After the exposure period, the evaluation of the genotoxicity of the substances was carried out using Comet assay and RAPD-PCR technique. Gills were removed, and cells were isolated by enzymatic digestion with a solution of 0.1 mg/ml dispase II in 20‰ Hanks' Balanced Salt solution (HBSS), for 20 min at 37°C. The cellular suspension obtained by filtration with nylon net filters (80 µm) was centrifuged at 1000 rpm for 10 min. Alkaline and neutral versions of Comet assay were performed according to the protocol by Tice et al., 2000. The same procedure was applied also to evaluate DNA damage in DLEC cell cultures.

The Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)-PCR technique was used for identifying DNA damage by means of a random amplification of fragments using PCR. The digestive glands of *in vivo* exposed mussels and DLEC cells were processed according to Atienzar and Jha, 2006.

## Results

### IN VITRO

#### Mussels

Comet assay analysis on *M. galloprovincialis* gill cells treated in vitro with TiO<sub>2</sub>-NPs highlighted a statistically significant increase of DNA single strand breaks, after treatment with the nano-powder alone at 10 µg/ml and of DNA double strand breaks at 0.1, 5 and 10 µg/ml ( $p < 0,001$ ) (Fig 1). The co-exposed with TCDD only showed the effect of dioxin in inducing DNA damage ( $p < 0,001$ ) (Fig.2).

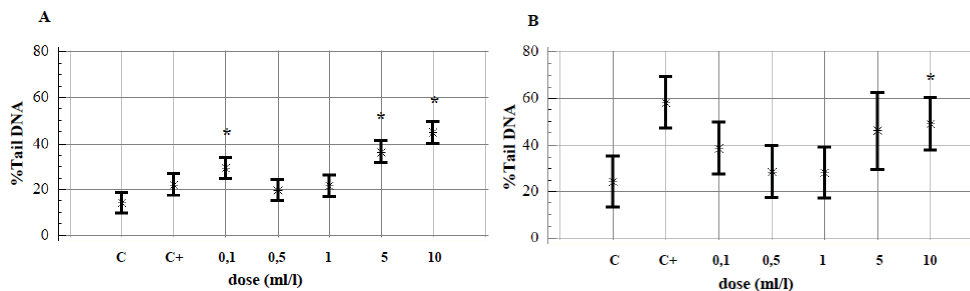


Fig. 1 DNA double strand breaks (A) and single strand breaks (B) in *M. galloprovincialis* gill cells treated in vitro with different doses of TiO<sub>2</sub>-NPs.

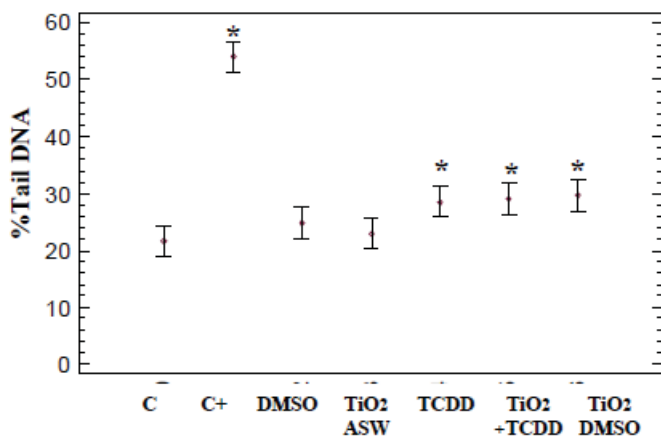


Fig. 2 DNA single strand breaks in *M.galloprovincialis* gill cells exposed in vitro to TiO<sub>2</sub>-NPs, TCDD and a combination of both substances.

#### DLEC

The exposure to TiO<sub>2</sub>-NPs induced a reduction of 50% of template genomic stability revealed by RAPD assay in sea bass cell line, while the co-exposure with Cd induced a decrease of genomic stability of 20%, also confirmed by data obtained with Comet assay (data not shown).

### IN VIVO Mussels

An induction ( $p < 0.05$ ) of single strand breaks in mussel gill cells (Comet assay) and a 70% genomic stability reduction (RAPD) in the digestive gland after 4 days exposure to Cd were detected. TiO<sub>2</sub>-NPs resulted to induce a 50% genomic stability reduction, and a 30 % reduction if co-exposed with Cd.

A statistically significant increase of DNA primary damage [ $p < 0.01$ ] by Comet assay (data not shown) and a 60% genomic stability reduction by RAPD after the exposure to TCDD was observed. TiO<sub>2</sub>-NPs resulted to induce a 50% genomic stability reduction, and a 40 % reduction if co-exposed with TCDD.

### *Discussion*

Although preliminary, our data revealed that TiO<sub>2</sub> possess a genotoxic potential, since a significant genomic stability reduction was found in sea bass cells and an increase of DNA strand breaks in mussel gill cells was observed after in vitro exposure. Moreover four days in vivo exposure to TiO<sub>2</sub>-NPs gave rise to a 50% reduction of genomic stability in mussel digestive gland. Interesting data come from DLEC exposure, where a marked genotoxic effect was found after exposure to coupled TiO<sub>2</sub>-NPs and Cd. This is in accordance with results obtained by Sun and co-workers (2009), which showed that TiO<sub>2</sub> nanoparticles have a significant metal adsorption capacity, confirming the importance of the Trojan horse effect.

The lack of a clear trend between the different scenarios investigated could be due to the high sensitivity of the tests applied, but it could also be related to the scarce information available concerning the mechanisms involved with TiO<sub>2</sub>-NPs induced DNA lesions.

Evidences from literature indicated ROS formation as one of the main factors possibly mediating TiO<sub>2</sub> NPs genotoxicity (Gurr et al., 2005; Trouiller et al., 2009; Barillet et al., 2010; Di Virgilio et al., 2010); however in some cases it has been shown a lack of correlation between the level of ROS and the level of the DNA damage observed (Toyooka et al., 2012), speaking in favor of complex mechanisms underlying TiO<sub>2</sub> NPs genotoxicity, such as DNA repair capabilities (Jugan et al., 2012).

### *Conclusions*

In conclusion, these preliminary results point in light the genotoxic potential of titanium dioxide nanoparticles in marine organism, but also suggest the necessity for further investigation in order to understand the complex interactions between TiO<sub>2</sub> and classical contaminants and interpret their actual ecotoxicological relevance.

### *References*

- Atienzar F.A., Jha A.N. (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res.*, vol. 613(2-3):76-102.
- Barillet,S., Simon-Dekers,A., Herlin-boime,N., Mayane-L'Hermite,M., Reynaud,C., Cassio,D., Gouget,B., Carrière,M. (2010). Toxicological consequences of TiO<sub>2</sub>, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. *J. Nanopart. Res.* Vol 12:61-73.
- Baun A., Sørensen S.N., Rasmussen R.F., Hartmann N.B., Koch C.B. (2008) Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C(60). *Aquat Toxicol.* Vol 86(3):379-87.

- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., de Mele, M.F.L. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary [CHO-K1] cells. *J. Hazard. Mater.* Vol 177: 711-718.
- Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B. (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol.* Vol 43(24):9216-22.
- Gurr J., Wang A. S.S., Cheng C., Jan K. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells". *Toxicology*, Vol 213 :66-73.
- Johnston H.J., Hutchison G.R., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Stone V. (2009) "Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics." *Part Fibre Toxicol.* Vol 6:33.
- Jugan M.L., Barillet S., Simon-Deckers A., Herlin-Boime N., Sauvaigo S., Douki T., Carriere M. (2012) Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology.* Vol 6(5):501-13
- Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M., Boller M. (2008) Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ Pollut.* Vol 156(2):233-9
- Kang, S.J., Kim, B.M., Lee, Y.J., Chung, H.W. (2008) Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Env. and Mol. Mutagenesis.* Vol 49:300-405.
- Matranga V., Corsi I. (2012) Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches. *Mar Environ Res.* Vol 76:32-40.
- Nagaveni K., Sivalingam G., Hegde M.S., Madras G. (2004) Photocatalytic degradation of organic compounds over combustion-synthesized nano-TiO<sub>2</sub>. *Environ Sci Technol.* Vol 38(5):1600-4.
- Nowack B., Bucheli T.D. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut.* Vol 150(1):5-22.
- Oliva F.Y., Avalle L.B., Cámara O.R., De Pauli C.P. (2003) Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO<sub>2</sub> particles, Part I. *J Colloid Interface Sci.* Vol 261(2):299-311.
- Pena M., Meng X., Korfiatis G.P., Jing C. (2006) Adsorption mechanism of arsenic on nanocrystalline titanium dioxide. *Environ Sci Technol.* Vol 40(4):1257-62.
- Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J., Jha A.N. (2008) Hydroxyl radicals (\*OH) are associated with titanium dioxide [TiO<sub>2</sub>] nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res.* Vol 640(1-2):113-22.
- Shi Y., Zhang J.H., Jiang M., Zhu L.H., Tan H.Q., Lu B. (2010) Synergistic genotoxicity caused by low concentration of titanium dioxide nanoparticles and p,p'-DDT in human hepatocytes. *Environ Mol Mutagen.* Vol 51(3):192-204.
- Sun H., Zhang X., Zhang Z., Chen Y., Crittenden J.C. (2009) Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite" *Environ. Poll.* Vol 157(4):1165-1170.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartman A., Kobayashi H., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki F. (2000). "The single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo testing". *Environ. Mol. Mutagen.*, Vol 35: 206-219.
- Toyooka T., Amano T., Ibuki Y. (2012) Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat Res.* Vol 742(1-2):84-91.
- Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiestl, R.H. (2009) Titanium dioxide nanoparticles induced DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* Vol 69(22):8784-8789.



Vevers,W.F., Jha,A.N. (2008) Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology*. Vol 17:410-420.

Zhang X., Sun H., Zhang Z., Niu Q., Chen Y., Crittenden J.C. (2007) Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles.*Chemosphere*. Vol 67(1):160-6.

# VALUTAZIONE DELLA GENOTOSSICITÀ DEL $\text{TiO}_2$ NEL MODELLO SPERIMENTALE *Danio rerio* (CYPRINIDAE, TELEOSTEI)

di I. V. Valentino, L. Rocco\*, V. Stingo

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche (STABIF), Seconda Università di Napoli - lucia.rocco@unina2.it

---

**Abstract** - Il biossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) è tra le nanoparticelle più utilizzate, costituendo ingrediente comune di 2 prodotti casalinghi, farmaceutici, cosmetici ed industriali. Il nostro studio ha valutato il suo potere genotossico mediante studi condotti sul modello sperimentale *Danio rerio* con l'utilizzo di metodiche valide nella determinazione del danno sul DNA come il Test Comet, il Diffusion Assay e la tecnica RAPD-PCR. Gli esemplari di zebrafish sono stati esposti al biossido di titanio (1, 5 e 10 mg/L) per diversi tempi di trattamento e per 5, 7, 14, 21 e 28 giorni. Tali tecniche hanno mostrato che il  $\text{TiO}_2$ , per le dosi e i tempi testati, è un agente capace di arrecare un effetto geno e citotossico che aumenta all'incrementare della concentrazione.

Parole chiave:  $\text{TiO}_2$ , NPs, genotossicità, Comet assay, RAPD-PCR, *Danio rerio*

## Introduzione

Esistono vari tipi di nanoparticelle aventi diversa origine. Siccome le nanoparticelle sono state trovate in sedimenti marini e in ghiacciai, si è giunti a considerarle come sostanze che sono presenti sul nostro pianeta sin dalla sua nascita, ed è probabile che molti organismi abbiano sviluppato meccanismi di tolleranza e adattamento a questo tipo di materiali. Tuttavia, negli ultimi decenni, a causa della grande corsa per lo sviluppo alle nanotecnologie, oltre alle nanoparticelle di origine naturale, in ambiente vengono rilasciati, accidentalmente o intenzionalmente, anche nanomateriali artificiali. Queste sostanze potrebbero essere particolarmente persistenti nell'ambiente o contenere componenti tossici in concentrazioni o forme strutturali che non ricorrono naturalmente e per questo, gli organismi non possiedono sistemi di difesa o adattamento naturali [Handy et al. 2008]. Grazie alle loro ridotte dimensioni, le nanoparticelle possiedono proprietà e caratteristiche differenti dalle altre specie chimiche da cui si originano. Dato che i paesi sono ormai proiettati verso lo sviluppo tecnologico-industriale sempre maggiore e dato che le nanoparticelle, più di tutti il biossido di titanio, sono componenti che per i loro mille e più usi sono l'avanguardia dello sviluppo industriale, appare inevitabile un inquinamento ambientale da parte di queste sostanze, data soprattutto dalle loro ridotte dimensioni. Appunto per tali motivazioni lo scopo di tale lavoro è stato quello di saggiare la genotossicità del biossido di titanio e di indagare sui suoi potenziali effetti genotossici mediante studi in vivo. I test utilizzati sono stati il Comet Test, il Diffusion Assay e la tecnica RAPD-PCR.

## ***Materiali e metodi***

### *Esemplari*

Il modello sperimentale che abbiamo utilizzato per questo lavoro è stato *Danio rerio*. La scelta di questo teleosteo è dovuta a diversi fattori. In primo luogo è un pesce dalle dimensioni ridotte, il che ne facilita la stabulazione e il mantenimento. Viene studiato per ottimizzare le tecniche di riproduzione applicabili a specie marine d'interesse commerciale in piscicoltura. È un pesce estremamente diffuso negli acquari di tutto il mondo, sempre vivace e in movimento, è adatto per un acquario di comunità ed è piuttosto semplice ottenerne la riproduzione. Inoltre, come detto prima, dalle analisi comparative è stato dimostrato che molti geni di zebrafish presentano omologia con i mammiferi, uomo incluso, caratteristica che lo rende un modello ideale per lo studio della genotossicità di varie sostanze. I pesci zebra sono stati allevati in vasche da 50 L in cui sono state ricreate le condizioni del loro habitat. Dopo l'acclimatazione i pesci sono stati posti in vasche da 5 L, ognuna delle quali conteneva 17 esemplari. I tempi di esposizione utilizzati sono: 5, 7, 14, 21 e 28 giorni. La soluzione standard delle nanoparticelle di TiO (Nanosized Titanium dioxide P25), è stata fornita da Evonik Degussa (Essen, Germania). Le diluizioni sono state preparate al momento dell'uso in DMSO allo 0,001%. Trascorsi i diversi giorni di trattamento i pesci zebra sono stati sacrificati e sottoposti ai test di seguito descritti.

### *Comet Test e Diffusion Assay*

Entrambi i test sono stati eseguiti secondo la procedura descritta in Rocco et al. (2012a). Ad ogni esemplare sono stati prelevati circa 25 µl di sangue mediante prelievo al di sotto delle branchie con siringhe eparinizzate. I vetrini, sia per il Comet Test che per il Diffusion Assay, sono stati colorati con 100 µl di Bromuro di Etidio 30X ed infine coperti con un vetrino coprioggetto e sottoposti a lettura mediante microscopia a fluorescenza (Nikon Eclipse E-600) dotato di un filtro di eccitazione BP 515-560 nm e di un filtro di sbarramento LP 580 nm. Le immagini sono state acquisite utilizzando un programma di acquisizione (Komet versione 6.0.0, Kinetic Imaging).

### *RAPD-PCR*

Il DNA è stato estratto dal muscolo utilizzando il Kit High Pure PCR Template Preparation (ROCHE). 40 ng di ciascun campione sono stati sottoposti alla reazione di amplificazione utilizzando la Taq polimerasi puREtaq Ready-to-go-PCR (ROCHE). È stato utilizzato il primer 6 [5'-d[CCCGTCAGCA]-3'] (Rong e Yin, 2004) alla concentrazione di 5 pmol/µl. Il programma di amplificazione ha previsto 45 cicli (95°C per 1', 36°C per 1' e 72°C per 2') preceduti da una denaturazione iniziale a 95°C per 5'. I prodotti di reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% e visualizzati al transilluminatore previa colorazione del gel con bromuro di etidio. La stabilità genomica del template (GTS,%) è stata calcolata come segue:  $GTS [\%] = (1 - a/n) \times 100$ , dove "a" è il numero di bande elettroforetiche polimorfiche rilevate in ciascun campione trattato e "n" è il numero totale di bande nel controllo.

## ***Risultati***

### *Comet Test*

Gli unici dati statisticamente significativi si riferiscono alla concentrazione di trattamento di 10 mg/L. Come mostrato dal grafico contenente i valori ottenuti (Fig. 1A) si evince che il biossido di titanio concentrato 10 mg/L mostra genotossicità a

partire dal 14° giorno di trattamento, a tempi di esposizione più bassi, il danno non risulta significativo. I risultati mostrano anche che a 28 giorni di trattamento il danno ritorna a non essere più significativo.

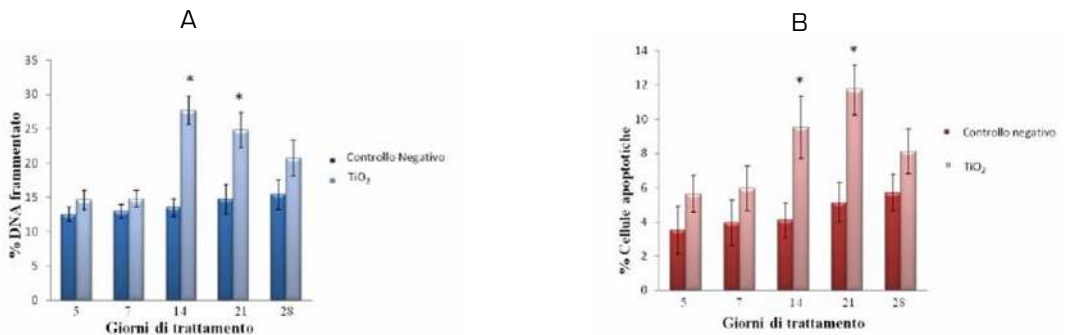


Figura 1. [A] % di DNA frammentato e [B] % di cellule apoptotiche in eritrociti di *Danio rerio* esposti al biossido di titanio concentrato 10 mg/L in relazione ai vari tempi di trattamento. \*  $p$ -value  $\leq 0,05$ .

#### Diffusion Assay

Anche i dati del Diffusion Assay non mostrano un danno statisticamente significativo indotto dal biossido di titanio alla concentrazione di 1 mg/L e 5 mg/L. I valori ottenuti dall'osservazione dei vetrini relativi al trattamento di 10 mg/L (Fig. 1B) sembrano rispecchiare quelli del test Comet, infatti la percentuale di cellule apoptotiche, statisticamente significativa, la ritroviamo a 14 e 21 giorni di trattamento.

#### RAPD-PCR

L'analisi RAPD-PCR ha permesso di valutare il danno molecolare indotto al DNA dal biossido di titanio. L'analisi molecolare RAPD (Fig. 2A) è stata condotta a 14, 21 e 28 giorni di esposizione. Nell'analisi molecolare si può notare che a 14 e 21 giorni di esposizione c'è un pattern di bande molto diverso dal controllo, che ritorna ad essere simile a quest'ultimo al 28° giorno di trattamento. Negli altri esperimenti condotti alle concentrazioni di 1 e 5 mg/L, dall'analisi molecolare RAPD si evince una mancanza di danno, in quanto i pattern elettroforetici risultanti dal controllo negativo e dai trattati risultano essere quasi sovrapponibili.

I profili elettroforetici ottenuti mediante RAPD-PCR sono stati utilizzati, inoltre, per valutare la percentuale di stabilità del genoma secondo Rocco et al. (2011). Nel calcolo del GTS si considerano sia il numero totale di bande presenti nel profilo del controllo negativo, sia il numero di polimorfismi (apparizione di bande e scomparsa di bande) presenti nei profili dei campioni trattati, trascurando, invece, la variazione di intensità di bande. Cambiamenti in questi valori sono stati calcolati come percentuale rispetto al controllo, posto pari al 100%. Questa analisi statistica ha permesso di mostrare come varia la stabilità genomica in seguito all'esposizione ad un agente genotossico. Il grafico GTS per gli esperimenti effettuati (Fig.2B) mostra come la stabilità del genoma si sia ridotta dopo 14 giorni di esposizione. Tuttavia il grafico mostra anche che la stabilità tende ad aumentare di nuovo (si avvicina a quella del controllo negativo) nei tempi successivi di esposizione.

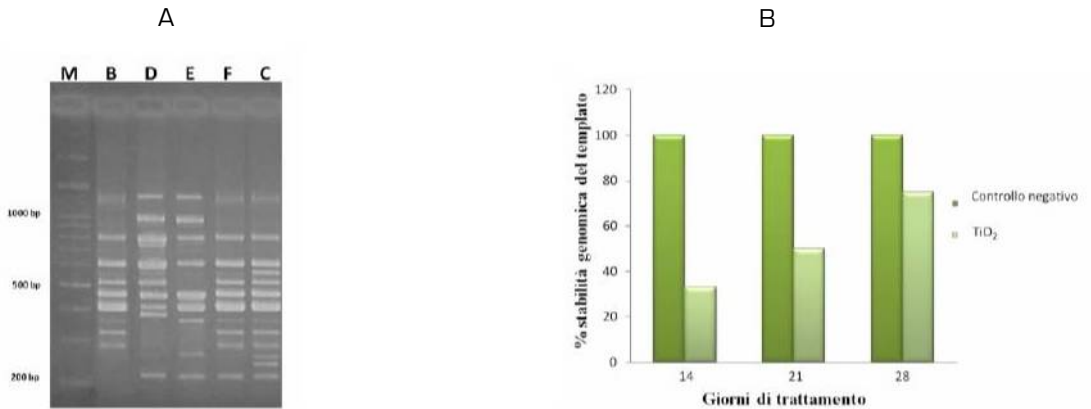


Figura 2. [A] RAPD-PCR di zebrafish trattati con biossido di titanio 10 mg/L. M: Marker 100 bp, B: Benzene, D:TiO<sub>2</sub> 14 gg, E:TiO<sub>2</sub> 21 gg, F: TiO<sub>2</sub> 28 gg, C: Controllo negativo. [B] % della stabilità genomica, GTS,% in zebrafish trattati con biossido di titanio 10 mg/L, in relazione ai vari tempi di trattamento.

### Discussione

Dalla sinergia dei test utilizzati si è potuto notare che si è avuta una maggiore induzione del danno alla massima concentrazione utilizzata per tempi intermedi di trattamento. L'andamento del biossido di titanio, lascia presupporre che esistano dei meccanismi tali per cui la genotossicità del biossido di titanio venga ridotta o attenuata. Uno dei probabili meccanismi può essere dovuto alla capacità dell'organismo di attivare meccanismi di difesa contro i radicali liberi dell'ossigeno, prodotti dall'esposizione al biossido di titanio. Tali meccanismi infatti, dopo un momento iniziale in cui vengono sopraffatti dalla grande quantità di radicali liberi dell'ossigeno prodotti dalla nanoparticella, si attivano e fervidamente riparano il DNA, provocando una riduzione del danno indotto dal biossido di titanio. Tuttavia bisogna ricordare che il biossido di titanio è una molecola che tende a formare aggregati e quindi un altro meccanismo che spiegherebbe l'andamento registrato in vivo, potrebbe essere dovuto a tale capacità, che, dopo un certo periodo di tempo, lo renderebbe non disponibile per le specie in esame (Allouni et al., 2009).

L'azione del biossido di titanio sul DNA di *Danio rerio* sembra essere concentrazione-dipendente. Infatti abbiamo condotto un numero maggiore di prove esponendo gli esemplari di zebrafish alle due concentrazioni di biossido di titanio pari a 1 e 5 mg/L. Da questa ulteriore analisi, si è potuto notare, la mancanza di un danno statisticamente significativo. Per quanto riguarda l'analisi RAPD oltre che un'analisi qualitativa è stata effettuata anche l'analisi statistica della variazione di stabilità genomica (GTS, %), che permette di valutare come varia la stabilità genomica del template in seguito all'esposizione ad un agente tossico. L'analisi del GTS riguardante i profili RAPD (TiO<sub>2</sub> 10 mg/L) mostra come la stabilità del template diminuisce, rispetto al controllo, in seguito all'esposizione al biossido di titanio e mostra, inoltre, anche come tale stabilità del genoma tende ad aumentare quando si superano i 28 giorni di trattamento, confermando quanto detto in precedenza. Sempre osservando i profili RAPD, abbiamo ipotizzato, infine, che tra tutte le possibili forme di danno al DNA che il biossido di titanio potrebbe indurre, quella che maggiormente entra in azione, determinando i diversi effetti avversi, è la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Possiamo affermare ciò in quanto dall'interpretazione

dei prodotti di amplificazione dei campioni di DNA è emerso che il danno genomico si esprime maggiormente mediante l'evento di comparsa/scomparsa di banda determinata da mutazioni puntiformi e riarrangiamenti a carico del DNA. Infatti, come di recente dimostrato da Shukla et al., (2011), il biossido di titanio induce l'aumento della 2-deossiguanosina (8-OhdG). La deossiguanosina è un costituente del DNA, che se ossidata si trasforma in 2-deossiguanosina (8-OhdG). La presenza di quest'ultima, evidenzia un danno ossidativo estremo, tale da alterare, dopo la membrana cellulare e quella nucleare, gli acidi nucleici causandone mutazioni e riarrangiamenti.

### ***Conclusioni***

Esistono vari tipi di nanoparticelle aventi diversa origine e numerosi studi hanno dimostrato il potenziale impatto delle nanoparticelle su una serie di organismi acquatici e della loro tossicità che può essere correlata alla loro dissoluzione, e alle loro proprietà di superficie o dimensioni (Moore, 2006; Canesi et al., 2010). I dati finora disponibili in letteratura sono considerati insufficienti per valutare la trasferibilità all'uomo attraverso la catena alimentare e l'importanza per la salute. È perciò necessaria una più approfondita valutazione della possibilità di passaggio di nanoparticelle dall'acqua ai pesci e dal suolo ai prodotti vegetali per poi entrare nella catena alimentare.

### ***Bibliografia***

- Allouni Z.E., M.R. Cimpan, P.J. Høl, T. Skodvin, N.R. Gjerdet (2009). Agglomeration and sedimentation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, vol. 68:83-87.
- Canesi L., C. Ciacci, D. Vallotto, G. Gallo, A. Marcomini, G. Pojana (2010). In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus hemocytes*. *Aquatic Toxicology*, vol. 96:151-158.
- Frenzilli G., M. Nigro, B.P. Lyons (2008). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, vol. 681:80-92.
- Handy R.D., R. Owen, E. Valsami-Jones (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, vol. 17:315-325.
- Moore M.N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, vol. 32:967-976.
- Rocco L., A. Izzo, G. Zito, C. Peluso, V. Stingo (2011). Genotoxicity in Zebrafish (*Danio rerio*) exposed to two pharmacological products from an impacted Italian river. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, vol. 1: 103.
- Rocco L., G. Frenzilli, G. Zito, A. Archimandritis, C. Peluso, V. Stingo (2012). Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants. *Environmental Toxicology*, vol. 27:18-25.
- Rong Z, H. Yin (2004). A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 96-103.
- Shukla R.K., A. Kumar, A.K. Pandey, S.S. Singh, A. Dhawan (2011). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress-mediated apoptosis in human keratinocyte cells. *Journal of Biomedicine Nanotechnology*, vol. 7:100-101.
- Singh N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider (2000). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, vol. 175:184-191.

# COMPARATIVE EFFECT OF QUANTUM DOT NANOPARTICLES ON THE GROWTH OF TWO MARINE MICROALGAE

by E. Salvadori, P. Cioni, E. Gabellieri, E. Morelli

Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pisa, Italy –  
elisa.salvadori@pi.ibf.cnr.it, patrizia.cioni@pi.ibf.cnr.it,  
edi.gabellieri@pi.ibf.cnr.it, elisabetta.morelli@pi.ibf.cnr.it

---

**Abstract** - In this study we evaluated the effect of CdSe/ZnS quantum dots (QDs) on the growth of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* and of the green alga *Dunaliella tertiolecta*, as biological models in the marine environment. The results showed that the effect on the growth was species-specific. QDs in the range 1 - 2.5 nM gradually inhibited the growth rate of *P. tricornutum*, more effectively than equivalent amounts of CdCl<sub>2</sub>. On the contrary, QDs did not affect the growth rate of *D. tertiolecta*, rather a modest stimulation was observed in the range 0.5 - 2 nM, suggesting an hormetic response. Our data also showed that *P. tricornutum* cells can adapt themselves to survive in QD-treated culture media.

Keywords: nanoparticles, marine microalgae, *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella tertiolecta*

## Introduction

The rapid increase of nanotechnology has raised the concern about the potential adverse effects of nanoparticles on the ecosystems and living organisms (Klaine et al., 2008). Quantum dots (QDs) are semiconductor nanocrystals, candidate to be widely used for biomedical applications and microelectronics, due to their unique optical properties (Michalet et al., 2005). There is a serious possibility that these materials might be released into the natural environment, especially aquatic environment, thus there is an urgent need to address several environmental risk assessment issues. A large and growing body of literature has reported data on toxicity of nanoparticles in aquatic organisms (Klaine et al., 2008; Navarro et al., 2008) but few ecotoxicological studies have been carried out on marine organisms and they mainly regard invertebrates and fishes (Moore, 2006; Bhatt and Tripathi, 2011). Nevertheless, this issue should not be neglected, since estuarine and coastal areas are the ultimate sinks for any discarded nanomaterials. Phytoplankton represents the first link of the food chain in natural waters, thus the knowledge of the mechanisms of uptake, accumulation and toxicity of nanoparticles in these unicellular organisms represents a crucial point for understanding their ecotoxicity. Among the literature available on phytoplanktonic algae, different kinds of QDs were reported to inhibit the growth rate (Wang et al., 2008; Xu et al., 2010), affect the algal photosynthesis (Liu et al., 2009), alter the transcriptomic profile (Domingos et al., 2011). The described effects largely depend on the surface, charge and size of nanoparticles, and the biological response seem to be species-specific (Klaine et al., 2008). In addition, in unicellular algae, the cell wall, being a primary site for interaction and a barrier for the entrance of toxicants, can play an important role in the interaction with nanoparticles (Worms et al., 2012).

In this work we have compared the effect of water-soluble CdSe/ZnS QDs on the growth of two species of marine microalgae belonging to different phyla, as models of biological receptor in the marine environment: the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, which is characterized by the presence of a rigid siliceous cell wall, and the green alga *Dunaliella tertiolecta*, which lacks a cell wall and is coated with a mucilaginous envelope.

### Materials and methods

Lumidot® CdSe/ZnS, orange quantum dots emitting at 590 nm (5 mg ml<sup>-1</sup> in toluene), were purchased by Sigma-Aldrich and transferred into aqueous media by encapsulating with the amphiphilic polymer poly(styrene-*co*-maleic anhydride) terminated with cumene (PSMA) and ethanolamine, by following the procedure reported by Lees et al. (2009). Chemical and optical characteristics of water-soluble QDs have been described elsewhere (Morelli et al., 2012) and reported in Table 1. Stable suspensions of water-soluble QDs were stored in the dark at + 4° C for a maximum of 3 months.

Table 1. Chemical and optical properties of a typical dispersion of water-soluble CdSe/ZnS QDs

Emission ( $\lambda_{max}$ )	Absorption ( $\lambda_{max}$ )	Core size (nm)	Hydrodynamic diameter (nm)	$\Sigma_M$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	[QDs] ( $\mu$ M)	[Cd] ( $\mu$ M)	[Zn] ( $\mu$ M)
591 nm	569 nm	3.5	12 ± 3	1.6x10 <sup>5</sup>	1.11	530	130

The unicellular marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) and the green alga *Dunaliella tertiolecta* were obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa, Dunstaffnage Marine Laboratory, UK. Stock cultures were grown in axenic conditions, at 21 ± 1° C and fluorescent daylight (100  $\mu$ mol photons × m<sup>-2</sup> × s<sup>-1</sup>) in a 16:8 light-dark cycle. Culture medium was natural seawater enriched with f/2 medium. Exposure experiments were carried out by inoculating algae from a stock culture (on day 7 of growth) to a fresh medium at an initial cell density of 5 × 10<sup>4</sup> cells ml<sup>-1</sup>. Aliquots of 500 ml of this culture were spiked with suitable amounts of water soluble CdSe/ZnS QDs, as to obtain a final range of QDs from 0.5 to 2.5 nM. The cultures were allowed to grow for 4 days during the exponential phase. Cell density was measured at the fourth day using a haemocytometer under a microscope or, alternatively, by recording the absorbance of chlorophyll *a* at 680 nm (JASCO V-550 UV/Vis Spectrophotometer). Finally, the growth rate, expressed as doublings × day<sup>-1</sup>, was calculated. In the exposure experiments, a control culture (no QDs added) was always used. Three replicates of the exposure experiments were carried out.

### Results and discussion

Exposure experiments were carried out with cultures of *P. tricornutum* and *D. tertiolecta* grown for 4 days in culture media containing CdSe/ZnS quantum dots. The range of QDs was from 0.5 to 2.5 nM, corresponding to a range of equivalent Cd and Zn concentrations of 0.24 - 1.2  $\mu$ M and 0.06 - 0.3  $\mu$ M, respectively. These exposure concentrations are similar or higher than those used in an our previous



paper focused on the chemical behaviour of CdSe QDs and their interaction with cultures of *P. tricornutum* [Morelli et al., 2012]. In that paper we showed that CdSe/ZnS QDs were not degraded, either in seawater or upon cell contact, and tended to aggregate when dispersed in a medium at high ionic strength, such as seawater.

The effect of QDs on the growth rate ( $\mu$ , doublings day<sup>-1</sup>) of *P. tricornutum* and *D. tertiolecta* was investigated by growing cells in culture media at increasing QD concentrations (initial cell density  $5 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup>). The growth rate of the control culture of *P. tricornutum* was  $1.3 \pm 0.2$  doublings day<sup>-1</sup> (n=3). In the range of QDs from 1 to 2.5 nM the growth rate gradually decreased, reflecting the inhibition of growth under QD exposure (Fig. 1 A). At the maximum dose ([QDs] = 2.5 nM), the growth rate was  $0.22 \pm 0.2$  doublings day<sup>-1</sup> (n=3). It was extrapolated that the 50% inhibition of the growth rate occurred at a [QDs] = 1.3 nM. Among the metals constituting the QDs (Cd, Se, Zn), Cd is the most toxic, thus we compared the toxicity of QDs with that of equivalent CdCl<sub>2</sub> concentrations. The results show a very low inhibition of the growth rate under Cd exposure (max inhibition 12% at [Cd] = 1.2  $\mu$ M). This low toxicity of Cd in this alga can be explained by its particular ability to produce phytochelatins (PCs), which sequester intracellular Cd in a non toxic form [Morelli and Scarano, 2001]. In a previous paper [Morelli et al., 2012], we used the synthesis of PCs in this alga as a biomarker of the presence of Cd ions released from QDs, and demonstrated that CdSe/ZnS QDs release negligible amounts of PC-inducing metal ions. Thus, these findings suggest that the inhibition of growth rate in response to QD exposure is due to the QDs themselves, and not the release of Cd ions. Further, we can infer that CdSe/ZnS QDs are more effective in inhibiting the growth rate of *P. tricornutum* than an equivalent amount of CdCl<sub>2</sub>. Similar conclusions were drawn also by other authors for zebrafish larvae [King-Heiden et al., 2009] and for the invertebrate *Hydra vulgaris* [Ambrosone et al., 2012].

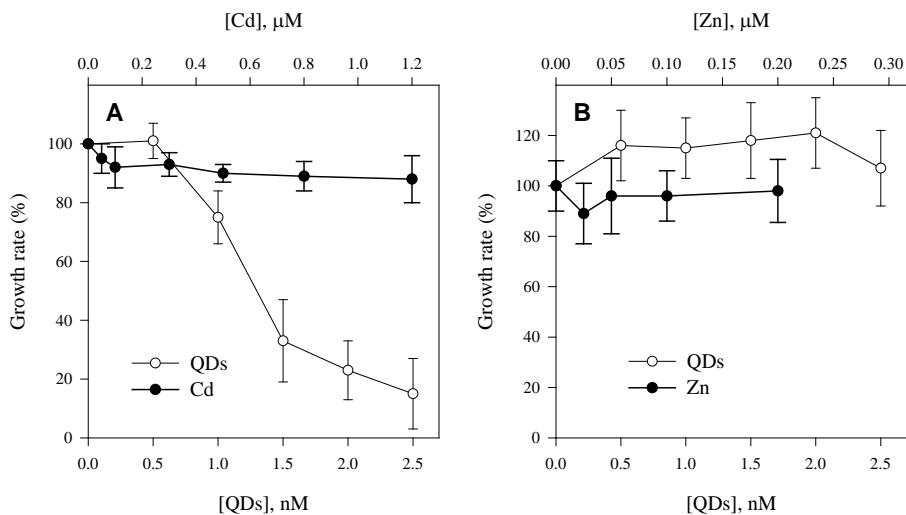


Figure 1. Growth rate of cultures of: (A) *P. tricornutum* exposed to CdSe/ZnS QDs or equivalent concentrations of CdCl<sub>2</sub> and (B) *D. tertiolecta* exposed to increasing concentrations of CdSe/ZnS QDs or equivalent concentrations of ZnCl<sub>2</sub>. Exposure time = 4 days. The values are expressed as percentages of the control culture. Data are means  $\pm$  st. dev. of three independent experiments.

As regards the green alga *D. tertiolecta*, no inhibition of growth rate was measured for the entire range of QD concentrations [Fig. 1 B]. On the contrary, a stimulatory effect was observed for [QDs]  $\leq$  2 nM. A similar transient positive effect on growth rate was previously observed in *P. tricornutum* cells exposed at [QDs]  $\leq$  0.2 nM [Morelli et al., 2012], and was attributed to hormesis. This effect should not surprise because is reported in the literature for experiments *in vivo* with nanoparticles [Iavicoli et al., 2010], including QDs [Xiao et al., 2012]. Hormesis is considered as a modest stimulation of the affected function (in our case, growth rate) at low doses and inhibition of the same at high doses, and is attributed to an adaptive response to toxicants [Calabrese et al., 2002]. We also evaluated the possibility that the positive effect might be due to the release of traces of  $Zn^{2+}$  from the shell of the nanoparticles, and tested the growth response of *D. tertiolecta* cultures exposed to a range of  $ZnCl_2$  concentration equivalent to that resulting from a complete degradation of CdSe/ZnS QDs. Fig. 1B shows that the addition of  $Zn^{2+}$  to the culture medium did not affect the growth rate of the green alga.

A follow up experiment was carried out with the diatom *P. tricornutum*, which resulted sensitive to QD exposure, in order to study the whole curve of growth. Figure 2 shows the growth curves obtained for cultures untreated and treated with increasing QD concentrations. Exponential growth was observed in all the cultures, but the QD addition induced a lag phase, whose length depended on the QD concentration. QD concentrations of 1 and 2 nM caused lag periods of 2 and 6 days, respectively, whereas at 2.5 nM QD, the lag phase reached 10 days. In particular, at the maximum QD dose, the cell density decreased suggesting the death of some cells, afterwards the growth resumed. For all cultures, after recovery, the cell density at the end of the logarithmic phase reached or was near the control level.

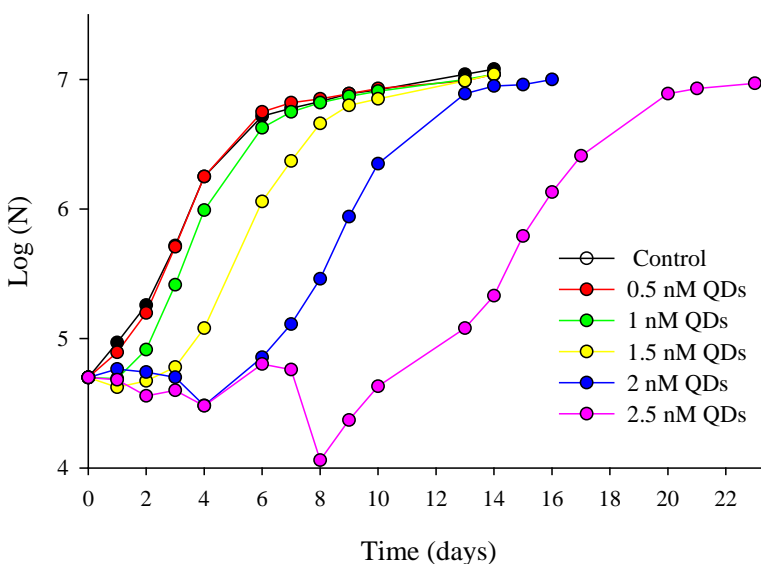


Figure 2. Curves of growth of cultures of *P. tricornutum* exposed to CdSe/ZnS QDs.  $N$  = cell number  $ml^{-1}$

In order to explain this behaviour, it can be hypothesized that the algae can adapt themselves to the new conditions and become more tolerant. In order to verify this hypothesis, algae coming from the culture at 2.5 nM QDs were inoculated in a fresh medium ([QDs] = 2.5 nM) and let to grow until the stationary phase. This procedure was repeated once again, and the growth curves were constructed (Fig. 3).

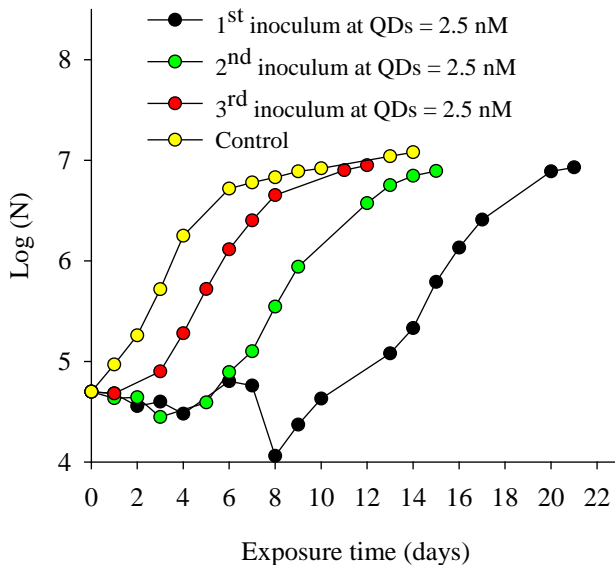


Figure 3. Curves of growth of cultures of *P. tricornutum* after successive inoculations in culture media at 2.5 nM QDs.  $N$  = cell number  $ml^{-1}$

The figure shows that successive inoculations decreased the lag phase, from 10 to 3 days, suggesting that the algae can adapt themselves to the presence of nanoparticles in the external medium, thus becoming more tolerant. Recent studies have shown that QDs can cause changes in the expression of general stress responsive genes in the freshwater model organism *Hydra vulgaris* [Ambrosone et al., 2012], and in mammalian cell cultures [Chen et al., 2012], as well as can alter the transcriptomic profile of the green alga *Chlamidomonas reinhardtii* [Domingos et al., 2011]. These findings suggest the occurrence of interactions at the DNA level. Further studies are needed to investigate the molecular mechanisms underlying this cellular adaptation in aquatic microorganisms.

## References

- Ambrosone A., L. Mattera, V. Marchesano, A. Quarta, A.S. Susa, A. Tino, A.L. Rogaci, C. Tortiglione (2012) Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. *Biomaterials* 33: 1991-2000.
- Bhatt I., B.N. Tripathi (2011) Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere* 82: 308-317.
- Calabrese, E.J. (2002) Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutation Research* 511: 181-189.

Chen N., Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, C. Fan (2012) The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 33: 1238-1244.

Domingos R.F., D.F. Simon, C. Hauser, K.J. Wilkinson (2011) Bioaccumulation and effects of CdTe/CdS quantum dots on *Chlamydomonas reinhardtii* - Nanoparticles or free ions? *Environmental Science & Technology* 45: 7664-7669.

lavicoli I., E.J. Calabrese, M.A. Nascarella (2010) Exposure to nanoparticles and hormesis. *Dose-Response* 8: 501-517.

King-Heiden T.C., P.N. Wicinski, A.N. Mangham, K.M. Metz, D. Nesbit, J.A. Pedersen, R.J. Hamers, W. Heideman, R.E. Peterson (2009) Quantum dot nanotoxicity assessment using the zebrafish embryo. *Environmental Science & Technology* 43: 1605-1611.

Klaine S.J., P.J.J. Alvarez, G.E. Batley, T.F. Fernandes, R.D. Handy, D.Y. Lyon, S. Mahendra, M.J. McLaughlin, J.R. Lead (2008) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology & Chemistry* 27: 1825-1851.

Lees E.E., T.L. Nguyen, A.H.A. Clayton, P. Mulvaney (2009) The preparation of colloiddally stable, water-soluble, biocompatible, semiconductor nanocrystals with a small hydrodynamic diameter. *ACS Nano* 3: 1121-1128.

Lin S., P. Bhattacharya, N.C. Rajapakse, D.E. Brune, P.C. Ke (2009) Effects of quantum dots adsorption on algal photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry C* 113: 10962-10966.

Michalet X., F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss (2005) Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science* 307: 538-544.

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

Morelli E., P. Cioni, M. Posarelli, E. Gabellieri (2012) Chemical stability of CdSe quantum dots in seawater and their effects on a marine microalga. *Aquatic Toxicology* 122-123: 153-162.

Navarro E., A. Baun, R. Bhera, N.B. Hartmann, J. Filser, A.J. Miao, A. Quigg, P.H. Santschi, L. Sigg (2008) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants and fungi. *Ecotoxicology* 17: 372-386.

Wang J., X. Zhang, Y. Chen, M. Sommerfeld, Q. Hu (2008) Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 73:1121-1128.

Worms I.A.M., J. Boltzman, M. Garcia, V.I. Slaveykova (2012) Cell-wall-dependent effect of carboxyl-CdSe/ZnS quantum dots on lead and copper availability to green microalgae. *Environmental Pollution* 167: 27-33.

Xiao Q., T. Giu, S. Huang, Y. Liu, Z. He (2012) Preparation and biological effect of nucleotide-capped CdSe/ZnS quantum dots on *Tetrahymena thermophila*. *Biological Trace Elements Research* 147: 346-353.

Xu M., G. Deng, S. Liu, S. Chen, D. Cui, L. Yang, Q. Wang, (2010) Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on *Phaeodactylum tricornutum*. *Metallomics* 2: 469-473.

# ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF ZNO NANOPARTICLES IN SEAWATER

by S. Manzo<sup>a</sup>, S. Buond<sup>b</sup>, M. L. Miglietta<sup>a</sup>, G. Rametta<sup>a</sup>, G. Di Francia<sup>a</sup>

<sup>a</sup>ENEA CR Portici P.le E.Fermi 1 80055 (Na) - sonia.manzo@enea.it

<sup>b</sup>Università degli Studi di Napoli Federico II. Parco Gussone , 80055 Portici (Na).

---

**Abstract** - The effects produced by nanoparticles of ZnO were investigated for some marine organisms were compared to the toxic effects of Zn ions [ZnCl<sub>2</sub>], to specifically indagate the Zn<sup>2+</sup> contribution to nano-ZnO toxicity and with bulk ZnO to evaluate the toxicity linked to the nanosize.

Keywords: nanoparticles, ZnO, *P.lividus*, *D.tertiolecta*

## ***Introduction***

Due to the increased production of synthetic nanoparticles (NPs), the occupational and public exposure is supposed to increase dramatically in the coming years as well as their potential release in the environment. Nanoparticles of ZnO, having adsorbing properties in the UV wavelength range, are commonly added to sunscreens and cosmetics. Therefore, high concentrations in coastal marine environment could be reasonably supposed, especially during the summer season when a rapid washing of sunscreen in the seawater can be estimated. The fate and the behaviour of NPs in seawater strongly depend on different physic-chemical characteristics that could affect aggregations and colloid chemistry. It is well-known that NPs tend to aggregate in aquatic environments to form micrometer-sized particles and it is likely that this state of dispersion may reduce the influence of particle size, shape and surface properties on their ecotoxicity.

Our research work, about this peculiar environmental matrix, started with the evaluation of adverse effect of four different NPs (ZnO, SiO<sub>2</sub> Carbon black, SWCNT) towards marine organisms with different biological complexity (sea urchins, crustaceans and algae). Successively, we focussed our concerns on nano ZnO effects upon marine microalga *D. tertiolecta*, and the sea urchin *P. lividus* as they were the most sensitive among the tested species. The aim was to establish the main toxicity parameters and to evaluate whether nano-ZnO produced toxic effects which can be clearly ascribed to peculiarities of the nanostate.

## ***Materials and methods***

Stock solutions of each testing material (nano-ZnO, bulk ZnO and ZnCl<sub>2</sub>) were prepared by dispersing dry powders into artificial seawater (ASW) to the final concentration of 100 mg L<sup>-1</sup>. The stock solutions were properly diluted to carry out the toxicological assays in concentrations ranged between 0.01 to 10 mg Zn L<sup>-1</sup>. Hydrodynamic diameters of nano-ZnO and bulk ZnO dispersions in seawater at 10 mg L<sup>-1</sup> were characterized by DLS technique using the Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments.

Algal bioassays were performed According to IRSA-CNR (1978).

Sea urchin embryotoxicity and spermioxicity test were performed according to Manzo et. al., 2006

### ***Results and Discussion***

As far as the aggregation rate and size may be relevant to the bioavailability of the dispersed particles in the marine ecosystem, the size distribution of ZnO particles was monitored. Relying on *D. tertiolecta*, which is a marine unicellular chlorophyta commonly used in standard chronic algal toxicity testing, we recorded dose response curves for exposure to nano-ZnO and calculated its main toxicological parameters. Dose response curves were measured also for exposure to bulk ZnO in order to check any specificity in the nanosized material with respect to its bulk counterpart. The findings were also compared to the toxic effects of free Zn<sup>2+</sup>, to specifically investigate the metal ions contributions to ZnO toxicity. The early development, fertilization, and offspring quality of the Mediterranean sea urchin *P. lividus* was also investigated. These findings are also compared to the toxic effects of Zn ions [ZnCl<sub>2</sub>], to specifically investigate the Zn<sup>2+</sup> contribution to nano-ZnO toxicity and with bulk ZnO to evaluate the toxicity linked to the nanosize.

### ***References***

IRSA-CNR. Metodologia di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine. Quaderni dell' Istituto di Ricerca sulle Acque n. 39-IT. ISSN 0390-6329 Milano, 1978. p. 116

Manzo S., Buono S., Cremisini C. (2006) Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51: 61–68

# ECOTOXICOLOGICAL RESPONSES IN MARINE MUSSELS AND POLYCHAETES EXPOSED TO NANOHORNS

by V. Moschino<sup>1</sup> \*, N. Nesto<sup>1</sup>, S. Barison<sup>2</sup>, L. Fedele<sup>3</sup>, F. Agresti<sup>2</sup>, L. Colla<sup>3</sup>,  
L. Da Ros<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Marine Sciences, ISMAR – CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia, Italy  
vanessa.moschino@ve.ismar.cnr.it

nicoletta.nesto@ve.ismar.cnr.it

luisa.daros@ve.ismar.cnr.it

<sup>2</sup> Institute for Energetics and Interphases, IENI– CNR, Corso Stati Uniti 4, 35127  
Padova, Italy

simona.barison@ieni.cnr.it

f.agresti@ieni.cnr.it

<sup>3</sup>Institute of Construction Technologies, ITC – CNR, Corso Stati Uniti 4, 35127  
Padova, Italy

laura.fedele@itc.cnr.it

laura.colla@itc.cnr.it

---

**Abstract** - Single Walled Carbon NanoHorns (SWCNHs) are black nanoscale cylindrical tubes of graphitic carbon which differ from nanotubes in their “horn-like” shape. This material has the capability of providing a high surface area making it the best electricity conductor on nanoscale level. We evaluated the toxicology of SWCNH powders in exposure experiments with two marine species, selected on the basis of their ecological role, i.e. polychaetes, *Hediste diversicolor* -living in and feeding on sediments, the possibly sink for aggregated nanoparticles, and mussels, *Mytilus galloprovincialis* -filtering large volume of water for feeding, thus exposing a large body surface to suspended nanoparticles. Mussels and polychaetes were exposed to three SWCNH concentrations (1, 5, 10 mg l<sup>-1</sup>) and acute effects were evaluated after 24 and 48hrs, by estimating as end-points various signals of impaired cellular functions, thus of sub-lethal effects, such as variations in lysosomal parameters and lipofuscin content, and in the antioxidant system activities

Keywords: Nanohorn toxicity, mussels, polychaetes, biomarkers.

## **Introduction**

The potential ecotoxicological risk associated with nanomaterials (NMs) has recently aroused growing interest, particularly as regards the occurrence, behaviour and fate of engineered nanoparticles in the marine environment. The development and use of emerging nanomaterials is increasing at an ever accelerating rate in many industrial areas (e.g., materials science, personal care products, electronics and, more recently, medicine), due to their exceptional physico-chemical properties (Perez et al., 2009; Farré et al., 2011) and it is expected that these materials will find their way into the environment, and in particular the marine environment which is the ultimate sink for almost all contaminants (Kaegi et al., 2008). NMs, consisting of natural,

incidental and/or engineered particles, are defined as materials having nanostructured components with at least one dimensions less than 100 nm, including nanofilms and nanocoatings, with one dimension <100 nm, nanotubules and nanowires, with two dimensions at the nanoscale, and then nanoparticles (NPs) [Moore, 2006]. Engineered nanoparticles can be classified in five groups: carbon NMs, metal-oxide NPs, zero-valence metal NPs, quantum dots and dendrimers. The single-walled carbon nanohorns (SWCNHs) are short horn-shaped tube structures [diameter 3-4 nm, length 20-40 nm] with the apex capped with five pentagonal carbon rings. The geometry of the nanohorn [i.e. size, surface area, shape, solubility, aggregation], similar to that of single-walled nanotubes (SWNTs), fullerenes and graphene, defines a unique set of structural, mechanical and chemical properties. Diversely from individual nanotube, SWCNHs typically tend to assemble forming rough surface spherical aggregates, i.e. dahlia [Fig. 1], buds and seeds, with overall diameters of about 70-100 nm, which, unlike the bundle aggregates of SWNTs, give them a native very large surface area and seem to be useful for holding other materials, keeping their particle size small. Possible in vivo short-term effects of SWCNHs have been evaluated on two estuarine species, the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the polychaete *Hediste diversicolor* under laboratory conditions. Individuals of both species were exposed to 1, 5 and 10 mg/l SWCNHs for 24 and 48 h and then various biomarkers were assessed at different levels of biological complexity.

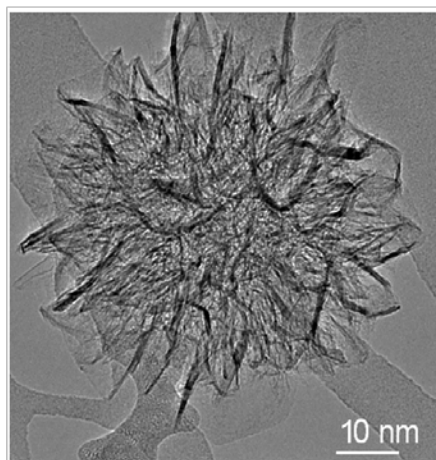


Fig. 1 – TEM Image of dahlia-like nanohorn

### **Materials and Methods**

Nanofluid preparation and particle size measurements: the SWCNHs were mechanically dispersed in deionized water. The homogenization was performed by an ultrasonic processor (VCX 130, Sonics & Materials) at 20 kHz and 70 W for 30 min. With this procedure a long term stability was assured to the dispersions. A Zetasizer Nano ZS (Malvern) was used to measure the average dimension of the nanoparticles in solution and to evaluate the tendency of nanoparticles to aggregate. This instrument can detect size from 0.6 nm to 6 µm using a Dynamic Light Scattering (DLS) process.

Exposure experiment conditions: 20 adult mussels, *Mytilus galloprovincialis*, and 30 adult polychaetes, *Hediste diversicolor*, were exposed to three SWCNH



concentrations in filtered sea water: 1, 5, 10 mg l<sup>-1</sup>. Acute effects were evaluated after 24 and 48 h. Biochemical determinations of the antioxidant systems were carried on in mussel digestive glands and in polychaete whole bodies as malondialdehyde content (MDA) [Gérard-Monnier et al., 1998] and glutathione peroxidase (GPX) activity [Gunzler and Flohe, 1985]. In mussel digestive glands only were also determined lysosomal membrane stability [Lowe and Pipe, 1994], lipofuscin content [Pearse 1972] and lysosomal structural changes [Lowe, 1981].

## Results

The low concentration and the polydispersity of SWCNHs in sea water caused several problems, i.e. unstable and unrepeatable DLS measurements in the 1 mg l<sup>-1</sup> samples. At higher concentrations, the results highlighted the presence of larger particles (from 250 nm up to 5 µm) caused by nanoparticles aggregation possibly occurring when the nanofluid is dissolved in sea water, due to pH effects on particle surface charge.

No mortality, both for mussels and worms, was observed under any experimental conditions. In worms, the MDA content was not affected during the first 24 h exposure, whereas an increase was observed after 48 h at the higher SWCNH concentrations, even if significant differences were detected only at 5 mg/l (Kruskal-Wallis:  $p < 0.05$ ). The GPX activity showed similar values comparing the various concentrations, a statistically significant depletion being observed only at 10 mg l<sup>-1</sup> after 48 h exposure. Slight variations were detected in MDA content determined in *M. galloprovincialis* digestive glands, an increase being observed only at 10 mg/l after 24 h exposure. The GPX activity evaluated in mussel digestive glands drastically decreased at the two higher SWCNH concentrations at both 24 h and 48 h (Kruskal-Wallis:  $p < 0.001$ ).

The neutral red retention times proportionally decreased with the increase of SWCNH concentrations, with more pronounced significant differences after 48 h exposure; as for lysosomal volume density, a narrow slight increase was detected at each SWCNH concentration at 24 h exposure, whereas at 48 h an increasing trend was observed, leading to a significant swelling of lysosomes at 10 mg l<sup>-1</sup> (Kruskal-Wallis:  $p < 0.05$ ). Lipofuscin granules, due to high SWCNH deposits accumulated in digestive cells were not quantifiable (Fig. 2).

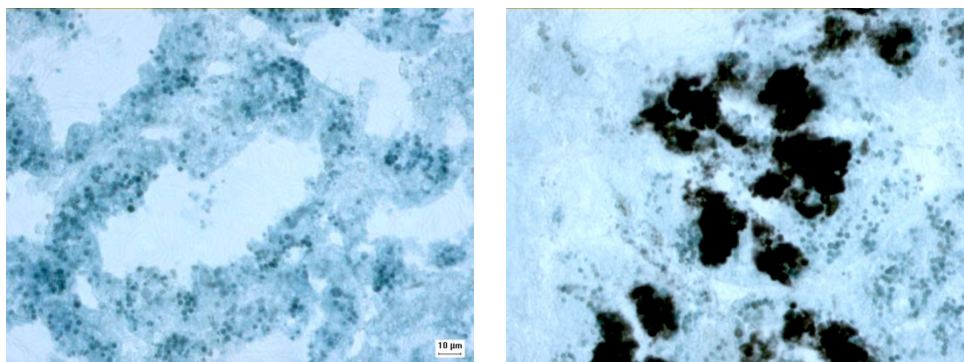


Fig. 2 - Lipofuscins and nanohorns accumulated in mussel digestive glands after 48 h exposure at 10 mg l<sup>-1</sup> (left: control; right: treated).

## Discussion

SWCNHs dispersed in filtered sea water showed a strong tendency to aggregate forming larger particles which quickly settled in the experimental tanks. The known aggregation behavior of nanoparticles in aquatic systems has linked to various abiotic factors such as pH, ionic strength, presence of organic matter (Hardy et al., 2008), and may be overcome by adding dispersant agents. However, we have chosen to test untreated non-dispersed SWCNHs being more ecological relevant (Hardy et al., 2008). In form of larger aggregates, nanohorns were observed to be rapidly ingested by exposed organisms, then inducing significant changes of the measured biomarkers in both *H. diversicolor* and *M. galloprovincialis*. However, no mortality was observed at any concentrations and mussels have been filtering during the whole experimental period.

The antioxidant system was more affected in *M. galloprovincialis* than in *H. diversicolor*. In particular, at the two highest SWCNH concentrations, the GPX activity dramatically decreased, and an increase of lipid peroxidation (measured as MDA content) was observed at 24 h. In polychaetes, the GPX activity showed a depletion only at the highest concentration after 48 h. All the parameters evaluated in mussel lysosomal systems were affected by SWCNHs, showing the worst conditions after 48 h exposure. These results demonstrate that, particularly in mussels, these nanoparticles may induce lysosomal changes and oxidative stress in the digestive system (Fig. 3), supporting the hypothesis that suspension feeders are significant target marine organisms for nanoparticles, as much as for more conventional contaminants.

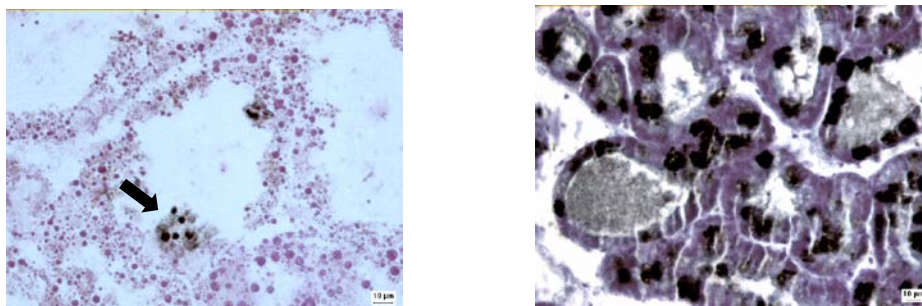


Fig. 3 - Digestive gland lysosomes marked with *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase (left) in mussel exposed to 1 mg l<sup>-1</sup> of SWCNHs at 24 h (arrow). Digestive gland tubules stained with Papanicolaou's in mussel exposed to 10 mg l<sup>-1</sup> of SWCNHs at 48 h (right).

## References

- Farré, M., Sanchis J., Barcelo, D. (2011). Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30(3): 517-527.
- Gerard-Monnier, D., Erdelmeier I., Regnard K., Moze-Henry N., Yadan J. C., Chaudiere J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* 11: 1176-1183.

Gunzler W.A., Flohe L., 1985. Glutathione peroxidase. In: Handbook of methods for oxygen Radical Research. CRC Press: 285-290.

Handy, R. D., von der Kammer F., Lead J. R., Hasselov M., Owen R., Crane M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17: 287-314.

Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M., Boller, M. (2008). Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution* 156(2): 233-239.

Lowe D. M., Pipe R. K. (1994). Contaminant Induced Lysosomal Membrane Damage in Marine Mussel Digestive Cells - an in-Vitro Study. *Aquatic Toxicology* 30: 357-365.

Lowe, D., Moore M., Clarke, K.R. (1981). Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology* 1: 213-226.

Moore, M.N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32(8): 967-976.

Pearse, A.G.E. (1972). *Histochemistry, Theoretical and Applied*, vol. 2. Churchill-Livingstone, London.

Perez, S., M. Farre, Barcelo, D. (2009). Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 28(6): 820-832.

# ANTIFOULING STRATEGIES AND SUSTAINABILITY: ECOTOXICITY ASSESSMENT OF POLYMERIC FOUL-RELEASE COATINGS.

by M. Oliva<sup>a</sup>, E. Martinelli<sup>b</sup>, G. Galli<sup>b</sup>, G. Monni<sup>a</sup>, C. Pretti<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, S. Piero a Grado (PI), Italy – moliva@vet.unipi.it

<sup>b</sup>Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Pisa, Italy - gallig@dccci.unipi.it

---

**Abstract** - 'Green' alternatives to biocide-based technologies are urgently needed by the marine coatings industry and there is considerable interest in developing biocide-free coatings. In this work we present the assessment of ecotoxicity of novel biocide free materials which combine low surface energy and low elastic modulus, two of the most important physico-chemical properties of the future generation of foul-release coatings.

Keywords: foul-release coatings, ecotoxicity, polymers.

## *Introduction*

Biofouling is a process of nanoscale adhesion, occurring at the interface between fouling organisms and all the man-made surfaces, in both marine and freshwater environments. It is a worldwide problem of high practical and economical relevance. In the case of ship hulls, the adverse effects caused by biological settlement include high frictional resistance, due to generated roughness, which leads in turn to an increase in fuel consumption. Moreover, hull cleaning, paint removal and repainting, and associated environmental compliance measures contribute to the cost of biofouling.

The control of this phenomenon has imposed environmental burdens through the use of toxic self-polishing tributyltin-based antifouling paints, which are now banned. Although current commercially available copper-based antifouling paints are moderately toxic against marine fauna and poorly toxic against mammals, they are much less effective than TBT-based coatings and require additional co-biocides to enhance their effectiveness. However, the current legislation has imposed a stricter evaluation and regulatory regime on the use of biocides. 'Green' alternatives to biocide-based technologies are therefore urgently sought by the marine coatings industry and there is considerable interest in developing biocide-free coatings. Two general strategies are typically followed in the design of novel, non-biocidal, non-fouling surfaces:

- antifouling coatings, in which the objective is to deter the recruitment stages of fouling organisms from attaching in the first place;
- fouling-release coatings, which do not prevent organisms from attaching, but the interfacial bond is weakened so that attached organisms are more easily removed by the hydrodynamic shear forces generated by movement of the ship through the water or by gentle 'grooming' devices.

In both cases the objective is to achieve the desired result through manipulation of the physico-chemical and/or materials properties of the coating, so that the organism either perceives the surface as uncondusive to settlement or the

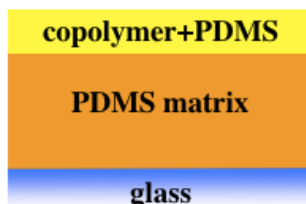
intermolecular interaction forces between the surface and the polymeric adhesives produced by the fouling organism are weakened, promoting adhesive failure.

It is generally accepted that low surface energy and low elastic modulus are two of the most important physico-chemical properties of the future generation coatings. Moreover, it is currently envisioned that a coating with surface complexities and imperfections at the micro-nano scale level can better comply with the nanosized cues of the foulants, thus minimizing the interactions with the organisms for an effective inhibition of their settlement and/or promotion of their release.

In keeping with this rationale, we developed novel biocide free materials which combine these properties into one polymeric system in a synergistic way. The materials were then assessed for marine ecotoxicity.

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

Surface active copolymers composed of a hydrophilic component (polyethylene glycol), a hydrophobic component (poly(dimethyl siloxane)) and a hydrophobic/lipophobic component (perfluorinated polymer) were synthesized and subsequently blended with poly(dimethyl siloxane) (PDMS) and spray coated on the top of a thicker bottom layer consisting of a cross-linked PDMS matrix (Fig. 1) on glass slides.



*Figure 1. Schematic representation of a biocide-free coating with a surface active polymer.*

A bismuth- or tin-based compound was used to catalyse the sol-gel cross-linking reaction of the PDMS matrix.

In order to assess acute ecotoxicity, we used a leaching protocol as described by Karlsson et al. [2010].

A pre-leaching (24 h) was performed and the leachates were discarded in order to prevent the effects of solvents and/or macroscopic residues.

Leachates (n=3/sample) were obtained by shaking (30 rpm) for 14 days in natural filtered autoclaved seawater the following samples (10 cm<sup>2</sup>/1 L water):

- G: glass without polymers
- Cu: glass covered with commercial antifouling paint (copper-based plus biocides)
- PDMS-t: glass covered with PDMS (tin as catalyst)
- PDMS-b: glass covered with PDMS (bismuth as catalyst)
- P1, P2 and P3: glass covered with foul-release coatings (bismuth as catalyst)
- P4 and P5: glass covered with foul-release coatings (tin as catalyst)

After 14 days leachates were collected and frozen at -20 °C until analysis.

The ecotoxicity of leachates was performed by the following ecotoxicological assays:

- *Vibrio fischeri*: inhibition of bioluminescence. The inhibition of bioluminescence test was performed according to standard operating procedure using the Basic protocol (Azur Environmental, 1995), based on the ISO procedures (2007).
- *Dunaliella tertiolecta*: inhibition of growth. The inhibition of growth of *D. tertiolecta* was evaluated according to the protocol described in ISO procedures (1995), with slight modifications. *D. tertiolecta* strain CCAP 19/27 was purchased from the reference centre CCAP [Culture Collection of Algae and Protozoa - Scottish Association for Marine Science/SAMS Research Services Ltd]. *D. tertiolecta* was cultured in f/2 medium (natural seawater supplemented with a salt mix and a vitamin mix).
- *Artemia salina* acute toxicity test (24 h). The hatching of *A. salina* cysts (Artemia Gold Argentemia) followed the procedure described in standardised short-term toxicity test (ARC-test) with *nauplii* (Vanhaecke and Persoone, 1981).

## Results

The obtained results highlighted the different toxic effects of the two catalysts.

Table 1: EC50 mean (% inhibition bioluminescence) of leachates (n=5 dilutions, n=3 replicates).

	EC <sub>50%</sub>
P2	27.22
PDMS-t	19.21
P4	25.18
P5	20.11
Cu	7.7

*Vibrio fischeri* in a screening test (% of effect of leachate tested at 100%), G showed lowest toxicity and Cu showed the highest toxicity (near to 100% of effect), as expected. PDMS-b, P1 and P3 showed absence of toxicity, lower than 20% of effect. The other samples polymers were the submitted in a full test in order obtain an EC<sub>20/50</sub> value, as shown in table 1:

*Dunaliella tertiolecta*: the growth of *D. tertiolecta* in a 72 h test was significantly inhibited only by Cu leachates respect to control (G).

*Artemia salina*: mortality % data in a 100% leachate test showed absence of toxicity in control, PDMS-b, P1 and P3 (Table 2).

Table 2: *A. salina* % mortality (20 organisms/replicate) in 100% leachates. Data are expressed as mean±SD (n=3 replicates)

	Mean	DS
G (control)	0	0
PDMS-b	0	0
P1	0	0
P2	66.67	15.28
P3	0	0
PDMS-t	75	10
P4	56.67	12.58
P5	70	8.66
Cu	18.33	10.41

### Discussion

Results showed an existing difference of toxicity between polymers with bismuth as catalyst and polymers with tin as catalyst. In particular, P1 and P3 showed low toxicity in all ecotoxicological assays. P4 and P5 polymers are based of the same polymers P1 and P2, respectively, except for the presence of tin (even if at very low concentration) as catalyst. Probably a release of tin in the leachates could negatively affect the metabolism of tested organism, except unicellular algae. From an ecotoxicological point of view, this approach could allow to select the polymers with the greater eco-sustainability.

### Conclusions

Once tested polymers for ecotoxicity, the next step should be the evaluation of antifouling performance in the laboratory and in field conditions. This work could be considered as an ecotoxicological screening test for polymers with promising foul-release characteristics, based on chemical-structural properties also extrapolated from literature.

### References

- ISO [1995]. ISO 10253: Water quality. Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.  
 ISO [2007]. ISO 11348-3: Water quality. determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Part 3: method using freeze-dried bacteria.  
 Vanhaecke P., Persoone G. [1981]. Standardised short term toxicity test with *Artemia nauplii* (ARC-test). INSERM 106: 370–376.  
 Karlsson J., Ytreberg E., Britta E. [2010]. Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. Environmental Pollution 158: 681–687.

# NANO-TiO<sub>2</sub> ECOTOXICITY FROM A BATTERY OF MARINE ORGANISMS

by D. Minetto<sup>a\*</sup>, G. Libralato<sup>a,b</sup> and A. Volpi Ghirardini<sup>b</sup>

a Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica - Università Cà Foscari Venezia, Campo della Celestia, 2737/b, I-30122, Venezia - diegominetto@gmail.com, voghi@unive.it

b ECSIN - European Center for Sustainable Impact of Nanotechnology, Veneto Nanotech S.C.p.A., 45100 - Rovigo, Italy - giovanni.libralato@unive.it

---

**Abstract** - Engineered nanomaterials (ENMs) are increasing their presence in the worldwide market due to their innovative properties. In particular, TiO<sub>2</sub> nanoparticles (nTiO<sub>2</sub>) are employed in many common products such as cosmetics and sunscreen creams. Since the seawater environment might be indicated as its final sink, concerns exist about their potential adverse effects towards seawater organisms. The present study is about the assessment of nTiO<sub>2</sub> toxicity towards a battery of testing species composed by the bacteria *Vibrio fischeri*, the algae *Phaeodactylum tricornutum*, the mollusc *Crassostrea gigas* and the crustacean *Artemia franciscana*. All toxicity tests were carried on according to the respective standardized protocols. On a case-by-case basis, some modifications were introduced to stress the testing conditions.

Keywords: TiO<sub>2</sub> nanoparticles, toxicity, saltwater organisms

## Introduction

Engineered nanomaterials are at the forefront of ecotoxicologist agendas due to their increasing use in a broad range of industrial and domestic sectors being manufactured in increasing amounts year-by-year such as in the case of TiO<sub>2</sub> nanoparticles (nTiO<sub>2</sub>). In particular, under UV irradiation, nTiO<sub>2</sub> shows photocatalytic properties (Bundschuh et al., 2011) generating ROS. Due to this property it is widely employed in many different applications (Keller et al., 2005; Chen and Poon, 2009; Fujishima et al., 2009). In particular, about the 65% of total nTiO<sub>2</sub> is estimated to be used for the production of various common cosmetics and sunscreen creams (Clemente et al., 2012). As aquatic environment is considered the final sink for many contaminants, it is plausible to assume that nTiO<sub>2</sub> may follow the same fate (Buffet et al., 2011). Many concerns arise about the nTiO<sub>2</sub> toxicity towards seawater organisms, but there is still a general lack of information about. In particular, the assessment of nTiO<sub>2</sub> toxicity on saltwater organisms is very complex due to the water salt content considering a salinity of about 35‰ and the relative ionic strength (~ 0.7 M) (Brant et al., 2005; French et al., 2009).

This research study was carried on to assess the nTiO<sub>2</sub> toxicity towards a battery of seawater organisms composed by the bacteria *Vibrio fischeri*, the unicellular algae *Phaeodactylum tricornutum*, the oyster *Crassostrea gigas* and the crustacean *Artemia franciscana*. All the tests were performed according to the respective standardized; on a case-by-case basis some modifications were introduced to assess



alternative scenarios.

## **Materials and methods**

### *nTiO<sub>2</sub> dispersion preparation and physico-chemical characterization*

The nTiO<sub>2</sub> (Aeroxide® P25 Titanium Dioxide powder - Evonik Degussa Corporation, Darmstadt, Germany) characterization was detailed in Minetto et al. (2010) and Marcomini et al. (paper under preparation).

### *Toxicity tests*

#### *Test with V. fischeri*

Gram-negative bacteria *V. fischeri* was employed to perform the bioluminescence inhibition test, according to the EN ISO 11348-3 (2006) and Azur Environmental protocol (1998). Toxicity was measured as a function of the bioluminescence inhibition of the microorganisms population (10<sup>6</sup> bacteria). The exposure concentration ranged between 10<sup>-9</sup> - 10 mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub> for 5, 15, 30 and 60 minutes. Quality Assurance (QA) and Quality Control (QC) procedures were taken into consideration.

#### *Test with P. tricornutum*

The growth inhibition static tests with *P. tricornutum* were performed according to the UNI EN ISO (10253, 2006). Toxicity was measured as a function of the cellular growth inhibition rate compared to the negative control. Exposure ranged between 0.09 - 90 mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub> for 72 h. QA/QC procedures were taken into consideration.

#### *Test with C. gigas*

The embryotoxicity static tests with *C. gigas* were carried on according to His et al. (1997) and ASTM (1998, 2004). Toxicity was measured as a function of the abnormal larvae frequency normalized to the controls. Zygotes were exposed to nTiO<sub>2</sub> ranging between 0.001 - 100 mg L<sup>-1</sup> for 24 h. QA/QC procedures were taken into consideration.

#### *A. franciscana*

*A. franciscana* 96 h static toxicity tests were performed according to APAT & IRSA-CNR (2003). Toxicity was measured as a function of the crustacean immobilization rate compared to the negative control. Larvae were exposed to nTiO<sub>2</sub> in the range 0.5 - 64 mg L<sup>-1</sup>. Three exposure scenarios were taken into consideration: (1) "light and feeding"; (2) "no light but feeding" in order to verify the light effects; (3) "light but no feeding" in order to investigate the starvation effect on the larvae. QA/QC procedures were taken into consideration.

## **Results and discussion**

### *nTiO<sub>2</sub> physico-chemical characterization*

The nTiO<sub>2</sub> characterization has been reported in Minetto et al. (2010) and Marcomini et al. (paper under preparation).

### *Toxicity tests*

#### *Test with V. fischeri*

No significant or very low toxicity effects were obtained from *V. fischeri* toxicity tests. After 5 minutes exposure, the highest inhibition effect (2% at  $10^9$  mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub>) rapidly decreased with increasing concentration. This phenomenon occurred in the concentration range between  $10^3$  and  $10^1$  mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub> also for 15 and 30 minutes exposure time, still decreasing at increasing concentration. The absence or very low nTiO<sub>2</sub> toxicity effect towards *V. fischeri* was confirmed by Heinlaan et al. (2008), Velzeboer et al. (2008) and Strigul et al. (2009). The increased exposure time did not significantly change the toxicity results obtained from lower contact time experiments.

#### *Test with P. tricornutum*

The lowest effect (1%) was determined at 0.09 mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub> and the maximum (28%) at 36 mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub>. The assessment of the overall database (n = 41 from 9 toxicity tests) suggested the following linear model:  $Y = 3.549 \ln(X) + 5.626$  (R<sup>2</sup> = 0.4930,  $\epsilon = 1.326$ ); so that, IC20 could be set at around 57 (42-72) mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub>.

To the best of our knowledge, only Miller et al. (2010) tested the potential toxicity of nTiO<sub>2</sub> towards four species of algae *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema marinoi* and *Thalassiosira pseudonana* (0, 10, 100, 500 and 1000 µg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub> as exposure scenario) evidencing that after 96 h exposure no significant adverse effects were detectable.

#### *Test with C. gigas*

The embryotoxicity test with *C. gigas* showed the maximum effect (83%) at the minimum concentration (1% mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub>); conversely, at 10 and 100 mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub> the toxicity effects were 2% and 4%, respectively. This event might be probably explained by ENMs surface area (Oberdörster et al., 2005; Savolainen et al., 2010). Indeed, it could be supposed that low nTiO<sub>2</sub> concentrations might involve smaller agglomerates presenting a higher total surface area.

#### *Test with A. franciscana*

The first scenario "light and feeding" evidenced a positive correlation between the toxicity effects and nTiO<sub>2</sub> concentrations, increasing with the exposure time. All the sub-scenarios (24, 48, 72 and 96 h) produced no toxicity or low toxicity effects until 16 mg L<sup>-1</sup>, whereas between 16 and 50 mg L<sup>-1</sup> very high toxicity effects were highlighted. Besides, the lowest toxicity effects were recorded at 64 mg L<sup>-1</sup> where agglomeration phenomena might have occurred thus reducing the overall toxicity. The nTiO<sub>2</sub> EC50 calculated at 24, 48 and 72 h were equal to 26.52 (25.30-27.80) mg L<sup>-1</sup>, 17.74 (17.24-18.25) mg L<sup>-1</sup>, 13.40 (12.42-14.45) mg L<sup>-1</sup>, respectively. At 96 h no EC50 could be calculated for nTiO<sub>2</sub> due to the high toxicity effects within the range of the tested concentrations. Only Ates et al. (2012) suggested that the mortality within a population of *A. salina* was 18% after 96 h at 100 mg L<sup>-1</sup> nTiO<sub>2</sub>.

The second scenario "no light but feeding" evidenced a decrease of nTiO<sub>2</sub> toxicity effects compared to the first one. Indeed, the toxicity effects were not higher than 40%, except for 0.5 mg L<sup>-1</sup> and 1 mg L<sup>-1</sup> at 48, 72 and 96 h sub-scenarios for which the recorded effects were 58%, 100%, 100% (0.5 mg L<sup>-1</sup>) and 62%, 73%, 100% (1 mg L<sup>-1</sup>), respectively.

The third scenario "light but no feeding" was expected to produce the hardest effects towards *A. franciscana* exposed populations. Indeed, the absence of feed might itself increase nauplii stress conditions. The EC50 calculated at 24 h was equal to 27.13 (25.34-29.05) mg L<sup>-1</sup>. After 48, 72 and 96 h no EC50 could be calculated for nTiO<sub>2</sub> due to the high toxicity effects within the range of the tested concentrations.

## *Conclusions*

A battery of testing species was taken into consideration to check the potential adverse effects of nTiO<sub>2</sub> considering various exposure scenarios. Some criticisms emerged from the experimental activities and the comparison with literature data. The main gap in the knowledge is about the real exposure scenario – a real time monitoring of agglomerates behavior, even during test performance, is really recommended to have enough information to understand the evolution and the cause of the potential highlighted adverse effects.

## *Acknowledgements*

We acknowledge Veneto Nanotech S.C.p.A. – ECSIN for partially funding this research activity

## *References*

- APAT and IRSA-CNR, Analytical methods for waters, Report 29 (2003).
- ASTM International, E 1563-98 (1998).
- Ates M., Daniels J., Arslan Z., O. Farah I. (2012) "Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity." *Environmental Monitoring and Assessment*: 1-10.
- Brant J., Lecoanet H., Wiesner M.R. (2005). "Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems." *Journal of nanoparticle Research* 7(4): 545-553.
- Buffet P., Fossi Tankoua O., Pan J., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J., Bérard J., Risso C., Guibbolini M., Roméo M., Reip P., Valsami-Jones E., Mouneyrac C. (2011). "Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles." *Chemosphere*.
- Bundshuh M. Zubrod J.P., Englert D., Seitz F., Rosenfeldt R.R., Schulz R. (2011). "Effects of nano-TiO<sub>2</sub> in combination with ambient UV-irradiation on a leaf shredding amphipod." *Chemosphere* 85(10): 1563-1567.
- Chen J. and Poon C. (2009). "Photocatalytic construction and building materials: From fundamentals to applications." *Building and Environment* 44(9): 1899-1906.
- Clemente Z., Castro V.L., Jonsson C.M., Fraceto L.F. (2012). "Ecotoxicology of nano-TiO<sub>2</sub> an evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems." *International Journal of Environmental Research* 6(1): 33-50.
- French R. A., Jacobson A. R., Kim B., Isley S.L., Penn L., Baveye P.C. (2009). "Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles." *Environmental Science & Technology* 43(5): 1354-1359.
- Fujishima A., Zhang X., Tryk D. (2008). "Solar photocatalysis, photodegradation of a commercial detergent in aqueous TiO<sub>2</sub> dispersions under sunlight irradiation." *Solar Energy* 77(5): 525-532.
- ISO, Standard 10253, Water quality - Marine Algal Growth inhibition Test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum* (2006).
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. (2008). "Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*." *Chemosphere* 71(7): 1308-1316.
- Keller V., Keller N., Ledoux M.J., Lett M.C. (2005). "Biological agent inactivation in a flowing air stream by photocatalysis." *The Royal Society of Chemistry* 2005.
- Miller R.J., Lenihan H.S., Muller E.B., Tseng N., Hanna S.K., Keller A.A. (2010).

"Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton." *Environmental Science & Technology* 44(19): 7329-7334.

Minetto D., Losso C., Libralato G., Callegaro S., Pojana G., Marcomini A., Volpi Ghirardini A. TiO<sub>2</sub> nanoparticles effects to saltwater organisms: preliminary results in David Pellegrini, Isabella Buttino, Margherita Secci, Simona Macchia, Letizia Dentone, Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici. Atti delle Giornate di Studio, Roma, ISPRA, vol. Serie Atti 2011, pp. 147-149, Convegno: Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici 4a Edizione, Livorno, 20-22 Ottobre 2010 (ISBN 9788844804817)

Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." *Environmental health perspectives* 113(7): 823-839.

Savolainen K., Alenius H., Norpa H., Pylkkänen L., Tuomia T., Kasperb G. (2010). "Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - A review." *Toxicology* 269(2-3): 92-104.

Strigul N., Vaccari L., Galdun C., Wazne M., Liu X., Christodoulatos C., Jasinkiewicz K. (2009). "Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*." *Desalination* 248 (2009): 771 - 782.

Velzeboer I., Hendriks A.J., Ragas M.J., Van de Meent D. (2008). "Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(9): 1942-1947.

# IN VIVO ASSAYS TO STUDY THE INTERACTION BETWEEN TiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES AND IMMUNE CELLS OF SEA URCHIN *PARACENTROTUS LIVIDUS*

by A. Pinsino and V. Matranga

Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare "Alberto Monroy" CNR, Palermo Italy - pinsino@ibim.cnr.it

---

**Abstract** - Nanoparticles (NPs) have emerged as a promising new nanomaterial with applications in biology, medicine, chemical engineering, and manufacturing technology. The presence of NPs in many consumer products has attracted a growing scientific concern on the possible effects of these materials on the environment and biota. In this report, we took advantage of an amenable model, the sea urchin *Paracentrotus lividus* to develop new assays to study the TiO<sub>2</sub>- NPs-immune cell interaction. By an *in vivo* assay, we found that TiO<sub>2</sub> NPs exposure stimulates phagocytic immune cells to form phagosomes, but does not induce internal membrane destabilization or dysfunction, nor it causes cell death of immune cells.

Keywords: Echinoderms; Immune system; Phagosome; Neutral Red; DiOC<sub>8</sub>

## *Introduction*

Nanotechnology is one of the most active research areas in our contemporary society. In fact, the NPs are now used in over 1,300 commercial and consumer products. But are they safe for organisms and the environment? At present, the toxicological and environmental effects of direct and indirect exposure to nanomaterials are poorly understood, especially regarding the marine environment. Without basic toxicological information, it is difficult to define environmental quality standards or perform risk assessments for threatening nanomaterials. To this end, it is important to understand what happens inside the organisms, especially at the cellular level. Taking advantage of the notion that marine invertebrates express qualitatively similar types of induced damage to those found in higher organisms, we focused our attention on the putative toxicity of NPs on immune cells of the sea urchin. Sea urchins are phylogenetically related to vertebrates and have been proved to possess a sophisticated and sensitive immune system. Their immune cells carry out functions similar to those of their vertebrate's immune system homologues, such as clot formation, phagocytosis, encapsulation, clearance of pathogens, oxygen transport, to name some (Matranga 1996). Phagocytes are the most abundant type of immune cells present in all coelomic spaces and in many tissues of the sea urchin (Matranga et al., 2006; Pinsino et al., 2008; Smith et al., 2010). To date, in mammals, NP incorporation is mostly attributed to phagocytic cells (monocytes and macrophages) that have the ability to engulf and eliminate certain of them; NPs can be internalized through phagocytosis/macropinocytosis, receptor-mediated endocytosis, or passive penetration, depending on the particle properties (Kim and Choi, 2012).

In our laboratory the interaction mechanisms between TiO<sub>2</sub> nanoparticles (NPs) and

sea urchin immune cells are under study. In this report, we focused on the design of *in vivo* assays by using organelle-specific dyes for live cell imaging, such as Neutral Red and 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide.

## **Materials and methods**

### *Exposure of adult specimens*

*P. lividus* adult specimens (4.5 -6.5 cm in diameter) were maintained for many weeks in aquaria containing artificial sea water (ASW). The ASW was oxygenated and maintained at 16-18°C. About 400 µl of sterile ASW containing TiO<sub>2</sub> NPs were injected into the coelomic cavity of groups of 2-3 animals, by a sterile syringe inserted into the peristomal membrane around the Aristotele's lantern. Three hours post-injection, 1 ml of coelomic fluid, containing the immune cells, was extracted from each sea urchin as previously described (Pinsino et al 2008). One day post-injection, immune cells were harvested, as a total cell population by bleeding of sea urchins through a cut in the peristomal membrane.

### *In vivo assays*

Living immune cells were incubated at room temperature (RT) in Neutral Red (NR) dye. As NR is a pH-sensitive dye used to follow the pH change of acid vesicles in living cells, it is considered a good marker of phagosome acidification (phagolysosome formation) in phagocytic cells. Staining of the internal membrane was performed at RT, in the dark, by the use of 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>), a green fluorescent membrane dye which, at higher concentrations, binds to the endoplasmic reticulum, Golgi and vesicle membranes. Immune cells were observed with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Zeiss, Aresse, Italy), equipped for epifluorescence, and recorded by a digital camera.

## **Results**

Phagocytosis is a complex process that involves membrane-lipid remodeling. It involves several well co-ordinated steps, like: i) the binding of the phagocyte receptor with a ligand; ii) the internalization of the particle with the formation of phagosomes; iii) the fusion of the phagosome with lysosomes to form phagolysosomes; and, iv) if the particle is digested by lysosome enzymes, the removal of the residues by exocytosis. It is known that the phagosomes are considerably alkaline, in fact, a transient increase in pH from 7.8 to 8.0 in the first few minutes after phagosome formation is observed. The pH decreases to approximately 6.0, 1 hour after particle internalization, and fuse with the lysosomes that liberate their lytic enzymes (Hampton et al., 1998).

In this report, we used the pH-indicator dye NR, to detect phagosomal pH dynamics in immune cells of sea urchin affected by TiO<sub>2</sub> NPs and the membrane-potential dye, DiOC<sub>6</sub>, to monitor internal membrane stability. Taking advantage of the notion that NR is colorless/yellowish at any pH greater than 6.8 and turns into red color at a pH below 6.8, we incubated immune cells after 3 and 24 hours of exposure to NPs with NR dye, followed by microscopical inspection. We found that NR became concentrated in lysosomes forming typical red vesicles within all free moving immune cells of the sea urchin. In addition, we detected the progression of the *bona fide* phagosomal maturation, only in phagocytic cells. Only few cells showed the leaking of NR that reflects the efflux of lysosomal contents into the cytosol following

lysosomal membrane disaggregation. Results suggest that TiO<sub>2</sub>NPs interacts with phagocytes by activating the uptake mechanism without cytotoxicity, ensuring the survival of the cells and animals.

In *in vivo* DiOC<sub>6</sub> labeling, showed a discrete fluorescence within the cytoplasm, more dense around the nuclei of all immune cells, indicating that TiO<sub>2</sub>NPs did not affect internal membranes polarization of endoplasmic reticulum, Golgi and other vesicle membranes. Interestingly, several cells showed a growing network of flat vesicles, suggesting a phagocytic activity in progress.

### ***Discussion***

Metal oxide NPs are widely used in paint and coating industries, but the knowledge of their possible interactions with the immune system of marine invertebrates is very scant. This requires an increase of our knowledge on the immune responses to NPs. In this context, phagocytic cells appear as an attractive system: they use phagocytosis “cell eating” for uptake of host particles such as bacteria and this mechanism of internalization may be considered the first step for degradation of particles larger than 0.5 μm. In fact, intracellular fate of host particles are known to be dependent on the mechanism of internalization. At high concentrations, metal oxide NPs tend to cluster, forming aggregates often larger than 100 nm that are efficiently phagocytized by macrophages *in vivo* (Kwon et al., 2009; Kim and Choi, 2012). They can be degraded in the lysosome and free ions released into the intracellular space or exocytosed as metal oxide or ions out of the cells (Stern et al., 2012; Tedja et al., 2012). The TiO<sub>2</sub> NPs used in this work, were calculated to have a 22 nm average size as primary particles and a 150/1600 nm one as secondary particles (Canesi et al., 2010). In agreement with previous reports present in the literature, our results showed that TiO<sub>2</sub> NPs, under the exposure conditions tested, are not cytotoxic, and suggest that TiO<sub>2</sub> NPs uptake into sea urchin phagocytic cells might be a detoxification strategy used to cope with hazardous materials and promote cell and organism survival.

In the future, our goals will be to answer the following questions: i) how are NPs taken up by immune cells; ii) where do they localize; iii) how do they interact with cell structures; iv) to what extent are they metabolized and secreted; v) how do they activate immune response and vi) how or if are exosomes involved. Exosomes have been recently discovered endogenous nanosized vesicles produced by most immune-competent cells, and inferred to play important roles in intercellular communications. NPs exposure could induce exosomes formation, or could be associated to the exosomes or localized inside exosomes, provoking immune activation and inflammatory responses (Andersson-Willman et al., 2012; Zhu et al., 2012).

### ***Conclusions***

Future studies on NPs uptake, cellular retention and localization, production of exosomes, should make an important contribution to our understanding of the intracellular trafficking mechanisms operating in sea urchin immune cells.

### ***Acknowledgements***

The authors gratefully acknowledge Dr. Ilaria Corsi for providing NPs, Professor Carla Falugi for providing DiOC<sub>6</sub> dye, and Mr. Mauro Biondo for help in maintenance of sea urchins in aquaria.

## References

- Andersson-Willman B., U. Gehrman, Z. Cansu, T. Buerki-Thurnherr, H.F. Krug, S. Gabrielsson, A. Scheynius (2012) Effects of subtoxic concentrations of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 264:94-103.
- Canesi L., R. Fabbri, G. Gallo, D. Vallotto, A. Marcomini, G. Pojana (2010) Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO<sub>2</sub>, Nano-SiO<sub>2</sub>). *Aquatic Toxicology*, vol. 100:168-77.
- Hampton M.B., A.J. Kettle, C.C. Winterbourn (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, vol. 92:3007-17.
- Kim S., I.H. Choi (2012) Phagocytosis and endocytosis of silver nanoparticles induce interleukin-8 production in human macrophages. *Yonsei Medical Journal*, vol. 53:654-7.
- Kwon Y.M., Z. Xia, S. Glyn-Jones, D. Beard, H.S. Gill, D.W. Murray (2009) Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro. *Biomedical Materials*, vol. 4:025018.
- Matranga V., A. Pinsino, M. Celi, G. Di Bella, A. Natoli (2006) Impacts of UV-B radiation on short term cultures of sea urchin coelomocytes. *Marine Biology*, vol. 149: 25-34.
- Matranga, V. (1996) Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata. In Müller, W.E.G., Rinkevich, B. (eds.), *Invertebrate immunology*. vol. 15. Springer, Berlin, Tokyo, pp 235–247.
- Pinsino A., C. Della Torre, V. Sammarini, R. Bonaventura, E. Amato, V. Matranga (2008) Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. *Cell Biology and Toxicology*, vol. 24:541–552.
- Smith L., j. Ghosh, K.M. Buckley, L.A. Clow, N.M. Dheilly, T. Haug, J.H. Henson, C. Li, C.M. Lun, A.J. Majeske, V. Matranga, S.V. Nair, J.P. Rast, D.A. Raftos, M. Roth, S. Sacchi, C.C. Schrankel, K. Stensvåg (2010) Echinoderm Immunity. In: Soderhall K (ed), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 708. Landes Bioscience, pp 261-301.
- Stern S.T., P.P. Adisheshaiah, R.M. Crist (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, vol. 92:3007-3017.
- Tedja R., M. Lim, R. Amal, C. (2012) Marquis Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano*, vol. 6:4083-93.
- Zhu M., Y. Li, J. Shi, W. Feng, G. Nie, Y. Zhao (2012) Exosomes as extrapulmonary signaling conveyors for nanoparticle-induced systemic immune activation. *Small*, vol. 8:404–412.



# MARINE ECOTOXICITY OF PRISTINE GRAPHENE, A NOVEL CARBON NANOMETRIC MATERIAL

by M. Oliva <sup>a\*</sup>, R. Di Pietro <sup>a</sup>, G. Monni <sup>a</sup>, C. Pomelli <sup>b</sup>, C. Chiappe <sup>b</sup>, C. Pretti <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, S. Piero a Grado (PI), Italy – moliva@vet.unipi.it

<sup>b</sup>Dipartimento di Farmacia, Pisa, Italy - cinziac@farm.unipi.it

---

**Abstract** -. The ecotoxicity of two different size of pristine graphene, a novel carbon nanometric material, was assessed. From this study it was concluded that the pristine graphene nanoparticles were toxic to *Vibrio fisheri* and *Dunaliella tertiolecta* following the direction PGMF>GNC1, showing that smaller nanoparticles exerted in an increase of toxicity. In the aquatic crustacean *A. salina*, no acute toxicity was registered, even if biomarkers of oxidative stress revealed a certain level of oxidative damage that could be interpreted as an early warning signal of damage at higher levels of biological organization.

Keywords: graphene, ecotoxicity, oxidative stress

## **Introduction**

Graphene, a two dimensional crystalline material comprising a single layer of sp<sup>2</sup> hybridized carbon atoms arranged in an honeycomb-like lattice structure, whose isolation and characterization led to the Nobel Price in 2010, has sparked a considerable scientific activity starting from its discover in 2004 [Novoselov et al., 2004]. In few years, the number of publications on graphene is increased exponentially: its exceptional physical properties (such as, the high electronic conductivity, good thermal stability, and excellent mechanical strength) have attracted the interest of the scientific community envisaging possible applications in strategic fields. The unique electronic properties of graphene have initially focused the attention towards the application in nanoelectronic [Westervelt, 2008]; however, as research in this field has expanded, other engineering applications have emerged, such as conducting polymers, supercapacitors, battery electrodes, printable inks, antibacterial paper, biomedical technologies [Stankovich et al., 2008]. When large amounts of new materials/products reach the market and inevitably the environment, unintended and potentially dangerous occupational, consumer and environmental exposures can occur. For this reason we investigated the marine ecotoxicity of two commercial forms of graphene.

## **Materials and methods**

### **Chemicals**

Two different commercial forms of graphene were studied: pristine graphene monolayer flakes (PGMF) and graphene nanopowder grade C1 (GNC1). In this study was also introduced graphite (GRF), the bulk material from which graphene derives. All characteristics of the studied substances are shown in table 1, as given by manufacturers.

Table 1: characteristics of PGMF, GNC1 and GRF, as given by manufacturers.

	Pristine Graphene Monolayer Flakes	Graphene Nanopowder Grade C1	Graphite
	PGMF	GNC1	GRF
Commercial source	Graphene Laboratories Calverton, NY (USA)	Graphene Laboratories Inc., Calverton, NY (USA)	Sigma-Aldrich St.Louis, MO (USA)
Purity [% carbon]	99.9	97	99.9
Form	Liquid [dispersed in ethanol], flakes	powder, flakes	powder
Average particle [lateral] size	~550 nm	5-25 $\mu$ m	<150 $\mu$ m
Average flake thickness	0.35 nm [1 monostrate]	5-30 nm	n.a.

GNC1 and GRF were resuspended in natural marine water (NSW), milliQ water, buffers or media; PGMF was resuspended in the same manner after an overnight evaporation of ethanol.

NSW (salinity 35 g/L) was oxygen saturated and filtered (0.21  $\mu$ m). All other chemicals, if not expressly described, were obtained from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

#### *Vibrio fischeri*: inhibition of bioluminescence

The inhibition of bioluminescence test was performed according to standard operating procedure using the Basic protocol (Azur Environmental, 1995), based on the ISO procedures (2007). In order to investigate whether PGMF, GNC1 and GRF (maximum concentration of 5 mg/L) could interfere in light emission, several light emission readings with activated bacteria at zero time were performed. Comparison tests of the effect of carbon particles on bioluminescence were conducted by adding 10  $\mu$ l of bacteria to each cuvette containing 1ml of suspension of the considered substance, and reading the light emission every 5 min for 30 min. Relative bioluminescence intensity was read directly on the instrument display and expressed in relative bioluminescence units (RBU).

#### *Dunaliella tertiolecta*: inhibition of growth

The inhibition of growth of *D. tertiolecta* was evaluated according to the protocol described in ISO procedures (1995), with slight modifications. *D. tertiolecta* strain CCAP 19/27 was purchased from the reference centre CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa - Scottish Association for Marine Science/SAMS Research Services Ltd). *D. tertiolecta* was cultured in f/2 medium (NSW supplemented with a salt mix and a vitamin mix).

#### *Artemia salina* acute toxicity test (24 h)

The hatching of *A. salina* cysts (Artemia Gold Argentemia) followed the procedure described in standardised short-term toxicity test (ARC-test) with nauplii (Vanhaecke and Persoone, 1981).

#### *Artemia salina* 48 h-exposure: oxidative stress

Nauplii were isolated with glass Pasteur pipettes from the parental stock cultures, and then immersed in the testing solutions. Tests were performed in 250 ml glass flasks covered with parafilm in a volume of 100 ml of testing solution as follow: control (NSW), PGMF (0.1 and 1 mg/L in NSW), GNC1 (0.1 and 1 mg/L in NSW),

GRF (0.1 and 1 mg/L in NSW). Tests were performed in a temperature of  $20 \pm 1$  °C and a photoperiod of 16 h light/8 h darkness, as reported by Nunes et al (2006). Three replicates were used per concentration. For all determinations about 2000 nauplii were used per replicate and per treatment. Values of pH, temperature and percentage of dissolved oxygen were measured every 24 h, for test validation purposes.

After the exposure period, animals were collected on a mesh and homogenized in ice-cold phosphate buffer (50 mM, pH 7) by sonication (Julabo bath sonicator, 10 seconds) and homogenization with a potter Elvejem. Aliquots of crude homogenates were stored at -80 °C until the determination of the extent of lipid peroxidation. Crude homogenates were also centrifuged at 15000xg for 10 min and supernatants were divided into aliquots and stored at -80 °C until used for the enzymatic determinations (glutathione peroxidase and catalase). On crude homogenates and supernatants the protein content was measured by the method of Lowry et al., (1951).

#### Lipid peroxidation (LP)

LP was determined in tissues homogenates using the colorimetric method of Uchiyama and Mihara (1978) by measuring the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Malondialdehyde (MDA) was used as standard.

#### Total glutathione peroxidase (GPx) assay

GPx activity was determined according to Carmagnol et al. (1983). GPx activity was determined by an indirect spectrophotometric method based on the oxidation of glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG) catalyzed by GPx, which is then coupled to the recycling of GSSG back to GSH utilizing glutathione reductase (GR) and NADPH (b-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced).

#### Catalase (CAT) activity

Catalase activity was determined by measuring the decrease in absorbance at 240 nm (Aebi, 1983). The reaction mixture contained 200  $\mu$ L of supernatant and 500  $\mu$ L of 50 mM phosphate buffer (pH 7) and the reaction was started by the addition of 300  $\mu$ L of hydrogen peroxide (30 mM). The decrease of absorbance was recorded in every 15 sec up to 3 min. Catalase activity was expressed  $\mu$ moles/ min/ mg of protein.

#### *Statistical analysis*

All data were represented as mean  $\pm$  standard error (or confidence limits). Oneway ANOVA followed by Dunnett's test for comparisons against control were conducted for data analyses (PRISM software, Graphpad Software). Magnitude values with  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### *Vibrio fischeri*: inhibition of bioluminescence

In order to investigate whether PGMF, GNC1 and GRF (maximum concentration of 5 mg/L) could interfere in light emission, several light emission readings with activated bacteria at zero time were performed: there was no evidence of light interference caused by the tested substances, comparing the results with a control (marine water) without the tested substances (Dunnet's test,  $p \leq 0.05$ ).

On PGMF, GNC1 and GRF a screening test was performed in order to evaluate the maximum percentage of effect (I%) at maximum concentration of 5 mg/L (table 2). GRF showed an I% lower than 20% (16.58%, CI 15.20-18.85%) and for this reason it was considered not necessary to perform a full test to find an  $EC_{20/50}$ . Otherwise, PGMF and GNC1 showed an I% higher than 20% (PGMF= 69.86%, CI 65.26-74.46%; GNC1= 33.19%, CI 29.84-36.55%) and were then submitted to a full test.

Full tests on PGMF and GNC1 are shown in table 3. PGMF showed  $EC_{50}$  values of 1.948 mg/L, 1.751 mg/L e 1.927 mg/L within duration of exposure of 5, 15 e 30 minutes, respectively.

GNC1 showed a lowest toxicity toward *V. fischeri* than PGMF. The highest I% (table 2) never exceeded 50 % so was not possible to obtain an  $EC_{50}$  value and an  $EC_{20}$  was calculated. After 5 minutes of incubation (table 3) the  $EC_{20}$  exceeded the maximum concentration [5 mg/L]. After 15 and 30 minutes of incubation GNC1 showed  $EC_{20}$  values of 1.567 mg/L [CI 1.487-1.647 mg/L] and 1.428 mg/L [CI 1.378-1.477 mg/L], respectively.

*Table 2: I% values (endpoint: decrease of bioluminescence) expressed as mean % of effect (inhibition of bioluminescence) in PGMF/GNC1-exposed cells of V. fischeri at maximum concentration of 5 mg/L (n=3; exposure duration=15 minutes). CL, confidence limits; CV, coefficient of variation.*

	PGMF	GNC1	GRF
I% (CL 95%)	69.86 (65.26-74.46)	33.19 (29.84-36.55)	16.58 (15.20-18.85)
I%      CV	2.65	4.06	4.32

*Table 3:  $EC_{20/50}$  values (endpoint: decrease of bioluminescence) expressed as mg/L of PGMF/GNC1-exposed cells of V. fischeri. Tests runned at six concentrations starting from 5 mg/L [serial dilution factor = 2]. Time, exposure duration; n, number of replicas; CL, confidence interval; CV, coefficient of variation.*

Time	n	PGMF		n	GNC1	
		Mean $EC_{20}$ (95% CL)	$EC_{20}$ CV		Mean $EC_{20}$ (95% CL)	$EC_{20}$ CV
5 min.	3	1.948 (1.924-1.972)	0.49	3	>5	n.a.
15 min.	3	1.75 (1.559-1.942)	4.41	3	1.567 (1.487-1.647)	2.05
30 min.	3	1.927 (1.821-2.032)	2.2	3	1.428 (1.378-1.477)	1.39

*D. tertiolecta*: inhibition of growth

Figure 1 shows the inhibition of growth of different concentrations of PGMF and GNC1. GRF, the bulk material from which graphene derives, showed any inhibition of growth respect to control at the tested concentration [5 mg/L]. Differently, PGMF and GNC1 showed a quite similar pattern of inhibition of growth. PGMF showed a LOEC (lowest observed effect concentration) of 0.675 mg/L ( $p < 0.05$ ) while GNC1 showed a LOEC of 1.25 mg/L ( $p < 0.01$ ). Estimated  $EC_{50}$  values are represented in table 4.

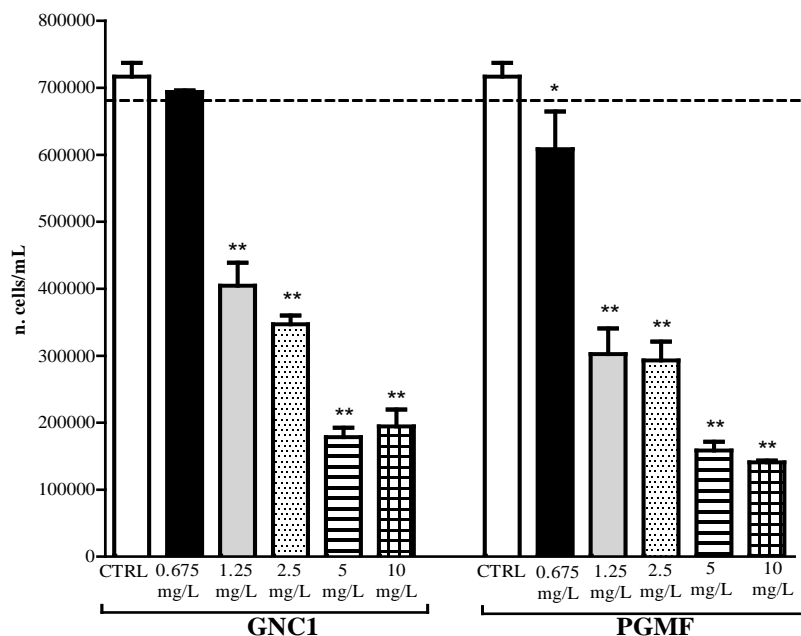


Figura 1: growth inhibition of *D. tertiolecta* cells exposed to serial dilution of PGMF, GNC1 and GRF (72 h incubation). Results are expressed as mean of 3 separated experiments ( $n=3$ /each experiment)  $\pm$  SD of number of cells/mL. Means were compared by one-way ANOVA (Dunnett's test). \*significantly different from control  $p \leq 0.05$ ; \*\*significantly different from control  $p \leq 0.001$ . Dotted line represents the mean ( $681667 \pm 20502$  cells/mL,  $n=3$ ) of GRF at the concentration of 5 mg/L.

Table 4:  $EC_{50}$  values [endpoint: inhibition of growth] expressed as mg/L of PGMF/GNC1-exposed cells of *V. fischeri*. Tests runned at five concentrations starting from 10 mg/L [serial dilution factor = 2]. Time, exposure duration;  $n$ , number of replicas; CL, confidence interval; CV, coefficient of variation.

Time	PGMF			GNC1		
	$n$	Mean $EC_{50}$ (95% CI)	$EC_{50}$ CV	$n$	Mean $EC_{50}$ (95% CL)	$EC_{50}$ CV
72 h	3	1.14 (0.99-1.58)	5.38	3	2.25 (1.25-3.26)	12.96

#### *Artemia salina*: acute toxicity test

In the acute toxicity test (24 h) no immobilization/mortality was recorded in any control or treated *A. salina* group, indicating absence of acute toxicity.

The observation by light microscopy (40X) of crustaceans at the end of the test revealed the presence of PGMF GNC1 into the gut (figure 2).

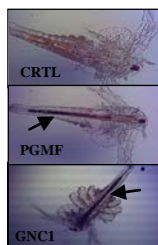


Figure 2: light microscope images of CTRL, PGMF- and GNC1-treated *A. salina* (24 h exposure, 1.25 mg/L). Arrows indicate the presence of PGMF or GNC1 into the gut

#### *Artemia salina* 48 h exposure: oxidative stress – CAT activity

In figure 3 CAT activity results of 48 h exposure of *A. salina* to GRF, PGMF and GNC1 (0.1 and 1 mg/L) are shown. Control group showed an activity of  $8.62 \pm 0.55$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$  No statistically differences from control group in GRF, PGMF and GNC1-0.1 mg/L-treated groups were observed.

In 1 mg/L-treated group, PGMF and GNC1 showed a CAT activity of  $17.59 \pm 1.73$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$  and  $17.41 \pm 4.19$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$ , respectively; both PGMF and GNC1-1 mg/L treated resulted significantly different from control group ( $p \leq 0.01$ ).

#### *Artemia salina* 48 h exposure: oxidative stress – GPx activity

In figure 4 GPx activity results of 48 h exposure of *A. salina* to GRF, PGMF and GNC1 (0.1 and 1 mg/L) are shown. Control group showed an activity of  $124.62 \pm 11.11$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot.}$  No statistically differences from control group in GRF and GNC1-0.1 and 1 mg/L-treated groups were observed.

PGMF showed a GPx activity of  $163.14 \pm 7.21$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot.}$  (0.1 mg/L treated group) and  $174.93 \pm 15.26$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot.}$  (1 mg/L treated group); these values resulted significantly different from control group ( $p \leq 0.01$ ).

#### *Artemia salina* 48 h exposure: oxidative stress – lipid peroxidation

Figure 5 showed the TBARS content in crude homogenate of *A. salina* exposed to GRF, PGMF and GNC1 at 0.1 mg/L and 1 mg/L. No significant differences were observed in all treated groups, except for PGMF 1 mg/L treated group that exhibited a TBARS content of  $12.39 \pm 1.5$   $\text{nmol}/\text{mg prot.}$  that significantly differs ( $p \leq 0.05$ ) from control values ( $9.28$   $\text{nmol}/\text{mg prot.}$ ).

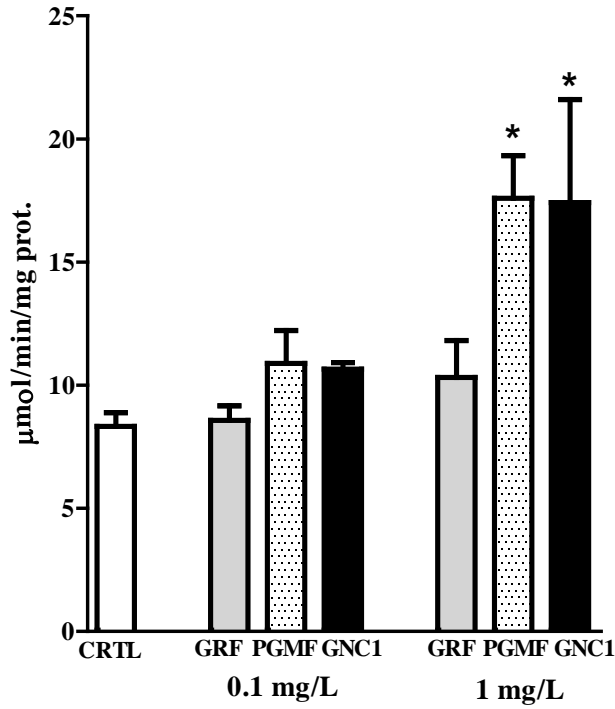


Figura 3: catalase activity in SN (15000xg) of *A. salina* exposed to 0.1 and 1 mg/L. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments (μmol/min/mg protein). Means were compared by one-way ANOVA (Dunnett's test). \*\*p<0.01

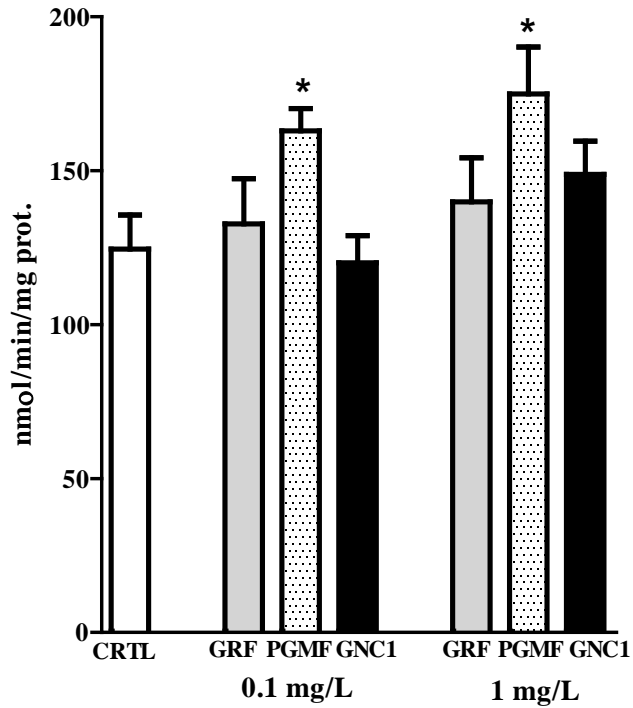


Figura 4: total glutathione peroxidase activity in SN (15000xg) of *A. salina* exposed to 0.1 and 1 mg/L. Results are expressed as mean±SD of three independent experiments (nmol/min/mg protein). Means were compared by one-way ANOVA (Dunnett's test). \*p≤0.01



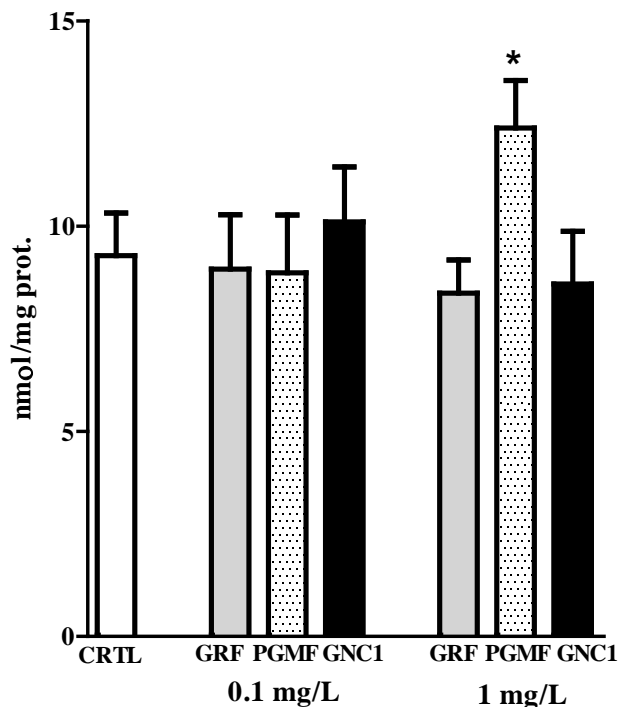


Figura 5: TBARS content in crude homogenate of *A. salina* exposed to 0.1 and 1 mg/L. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments (nmol/mg protein). Means were compared by one-way ANOVA (Dunnett's test). \* $p \leq 0.05$

### Discussion and conclusions

From this study it was concluded that the pristine graphene nanoparticles were toxic to *Vibrio fisheri* and *Dunaliella tertiolecta* following the direction PGMF>GNC1, showing that smaller nanoparticles exerted in an increase of toxicity. Regarding toxicity to the aquatic crustacean *A. salina*, no acute toxicity was registered, even if biomarkers of oxidative stress revealed a certain level of oxidative damage that could be interpreted as an early warning signal of damage at higher levels of biological organization.

### References

- Novoselov K. S., Geim A. K., Morozov S. V., Jjiang D., Zhang Y., Dubonos S. V., Grogorieva I. V., Firsov A. A. (2004) Electric field effect in atomically thin carbon films *Science*, 306: 666-669.
- Westervelt R. M. (2008). Graphene nanoelectronics. *Science*, 320: 324-325
- Stankovich S., Dikin D. A., Dommett G. H. B., Kohlhaas K. M., Zimney E. J., Stach E. A., Piner R. D., Nguyen SB T., Ruoff R. S. (2006). *Nature*, 442, 282-286.

## SESSIONE C: APPLICAZIONI DEL MANUALE ISPRA (67/2013) SULLE BATTERIE DI SAGGI ECOTOSSICOLOGICI PER SEDIMENTI DI ACQUE SALATE E SALMASTRE

*di Renato Baudo*

---

In questa sessione sono pervenuti 5 poster e sono state effettuate 3 comunicazioni orali.

La sessione ha evidenziato una interessante risposta da parte della comunità scientifica, in termini di accesso al sito web di ISPRA che riporta il Manuale ISPRA 67/2011. Tuttavia, non c'è stata l'attesa interazione con i possibili utenti, per la pressoché assoluta mancanza di commenti e/o suggerimenti migliorativi a tale Manuale. Considerando che tale mancata risposta potrebbe essere dovuta alla obiettiva difficoltà di utilizzare i sistemi di calcolo proposti (per la ponderazione delle batterie e per l'elaborazione dell'indice sintetico), ISPRA si riserva di verificare la possibilità di sviluppare un software, da abbinare in rete al Manuale ISPRA 67/2011, per facilitare tali elaborazioni.

Durante la sessione si è anche discusso sulle modalità di finanziamento per la realizzazione del sistema di calcolo (software) che potrebbero essere sostanzialmente due e/o l'insieme delle due:

- 1) una sostenuta direttamente o interamente da un privato;
- 2) una sostenuta dagli Enti interessati che cofinanzieranno lo sviluppo e il mantenimento del tool (che sarà un sito in rete sponsorizzato da tutti).

Inoltre, poiché tutte le batterie provate non sono state in grado di superare la soglia di accettabilità per la valenza ecologica e stato preso l'impegno di rivedere le definizioni e i requisiti adottati in questa prima versione del manuale, ad esempio considerando la soglia come "obiettivo", piuttosto che come soglia di ammissibilità.

Infine, è stato proposto un analogo manuale, dedicato però alle batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne (Manuale 88/2013), che è stato appena pubblicato sul sito ISPRA

# BATTERIE PER SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SU ACQUE INTERNE

*di R. Baudo*

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Verbania - r.baudo@ise.cnr.it

---

**Abstract** - Verrà illustrata l'attività di una commissione di studio costituita allo scopo di redigere un documento sulla applicazione di batterie di saggi ecotossicologici per l'esame delle acque interne e dei relativi sedimenti. Il documento si compone di 5 parti: Criteri di identificazione delle batterie; Criteri di giudizio per la valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi biologici; Identificazione degli organismi ed endpoint; Composizione e valutazione delle batterie; Scale ditossicità e indici integrati

Parole chiave: monitoraggio acque interne e sedimenti

## *Introduzione*

Nell'ambito della Commissione UNICHIM Qualità dell'acqua, Gruppo di Lavoro Metodi Biologici, il Sottogruppo Acque dolci, attraverso un esame critico della bibliografia internazionale e nazionale esistente, ha elaborato questo documento che propone alcune batterie di saggi biologici per effettuare una valutazione ecotossicologica delle acque interne.

Tali batterie di saggi verranno quindi proposte alla comunità scientifica italiana per un loro possibile utilizzo nell'ambito di indagini ambientali di vario tipo, quali i programmi di monitoraggio della qualità delle acque e il controllo degli effluenti in esse recapitanti previsti dai seguenti disposti legislativi:

- Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque recepite nell'ordinamento italiano nella Parte III del Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 e successive modifiche e integrazioni;
- Direttiva 2008/105/CE relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive del Consiglio 82/176/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE, nonché modifica della Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio recepite con il Decreto legislativo 10 dicembre 2010, n. 219;
- Direttiva 2006/7/CE relativa alla gestione delle qualità delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE recepite con decreto Decreto legislativo 30 maggio 2008, 116;
- Decreto Legislativo 152/06 e s.m.i. - Norme in materia ambientale G.U. 14.04.2006;
- Allegati parte terza D.Lgs. 152/06 e s.m.i. Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche (Artt. 53-176);

- Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, DECRETO 14 aprile 2009, n. 56 - Regolamento recante «Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». (09G0065) (GU n. 124 del 30-5-2009 - Suppl. Ordinario n. 83);
- Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, DECRETO 8 novembre 2010, n. 260 - Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo.(11G0035) (GU n. 30 del 7-2-2011 - Suppl. Ordinario n. 31).

Va precisato che le indicazioni emerse da questo Sottogruppo Acque dolci (consultivo) non hanno e non possono avere validità di protocolli vincolanti. Solo una eventuale adozione da parte delle Autorità competenti (ISPRA, UNICHIM, altre) conferirà loro la necessaria ufficialità.

L'attività del Sottogruppo Acque dolci ha portato alla redazione di un documento, composto di 5 parti.

### ***Parte 1 - Criteri di identificazione delle batterie***

Un approfondito esame della letteratura scientifica ha permesso di identificare un possibile approccio per la identificazione di batterie di saggi ecotossicologici differenziate in funzione del tipo di ambiente sul quale verrà effettuata l'indagine e dell'obiettivo prefissato. Infatti, le diverse combinazioni ambiente - obiettivo determinano i requisiti che la batteria di saggi ecotossicologici deve avere per quanto concerne matrici, organismi ed endpoint da utilizzare.

I possibili ambienti dovranno essere considerati in funzione delle caratteristiche ambientali generali e distinte per il tipo di substrato (duro, sabbioso-ghiaioso, fangoso, misto).

Le batterie devono essere identificate soprattutto in funzione del loro utilizzo di routine. Ad esempio, vanno privilegiati gli organismi allevabili, oppure facilmente reperibili per vie commerciali indipendentemente dal periodo stagionale (acquacolture e/o laboratori che commercializzano le specie di interesse, anche in forma di Toxkit). Per il requisito della praticità (specie allevabili e/o reperibili in commercio) sarebbe auspicabile che fossero creati degli "allevamenti centralizzati", in grado di fornire il materiale biologico a richiesta. Va però tenuto presente che l'adozione di specie allevabili, ma alloctone, potrebbe richiedere una autorizzazione e certamente, se venisse ravvisata l'esigenza di inserire una tale specie in una batteria, andranno indicate le opportune avvertenze per evitare l'introduzione nell'ambiente di una specie alloctona.

Poiché non è pensabile chiedere che ciascun laboratorio mantenga un numero molto elevato di allevamenti diversi, si deve cercare anche di contenere il più possibile il numero di saggi da includere in una batteria, pur mantenendo allo stesso tempo una buona copertura per sensibilità e rilevanza ecologica (tutte le batterie devono includere almeno batteri, alghe e invertebrati e prevedere la rilevazione di endpoint diversi dalla sola mortalità).

Ancora privilegiando l'utilizzo di routine, per i vari saggi preferibilmente andranno proposti sistemi statici, o al massimo semi-statici (con rinnovo periodico del mezzo acquoso), perché i sistemi a flusso continuo decisamente non sono alla portata di tutti i laboratori.

Per scelta, il gruppo di lavoro non ha preso in considerazione i biomarker, considerandoli allo stato attuale non proponibili per batterie di routine, anche in considerazione di alcuni aspetti negativi e delle difficoltà di interpretazione in chiave ecosistemica. Ciò non toglie che, tra le raccomandazioni, quando necessario si possa indicare anche la necessità di affiancare i saggi di tossicità con studi sulla composizione quali - quantitativa del benthos, di bioaccumulo, di biomarker.

Sulla base dei criteri così identificati, il Sottogruppo Acque dolci ha successivamente elaborato un metodo di valutazione delle batterie di saggi ecotossicologici che teoricamente potrebbero essere proposte. Tale metodo viene proposto e discusso nella Parte 2 del documento finale.

### ***Parte 2 - Criteri di giudizio per la valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi biologici***

In ecotossicologia è ormai accettato il principio che la potenziale tossicità di un materiale di prova (naturale e/o sintetico) possa essere accertata solo utilizzando una batteria di saggi ecotossicologici, poiché nessun singolo modello sperimentale è in grado di garantire in assoluto, da solo, l'attendibilità dei risultati per tutte le possibili tipologie di matrici e/o sostanze.

Resta, quindi, il problema di verificare quale batteria di saggi ecotossicologici sia effettivamente in grado di rispondere alle esigenze, in particolare considerando requisiti di scientificità e praticità: infatti, se da un lato è necessario garantire che i saggi biologici che compongono la batteria abbiano solide basi conoscitive sull'ecologia strutturale e funzionale dei modelli sperimentali proposti, dall'altro è indispensabile contenerne numero e complessità entro limiti ragionevoli, compatibili con una applicazione di routine.

Pertanto, sono stati identificati i criteri di giudizio sui quali basare una valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi ecotossicologici, così da consentire un confronto tra batterie già in uso e nuove batterie che, ipoteticamente, potrebbero essere proposte per conseguire obiettivi di salvaguardia ambientale di vario tipo.

In questo documento, che riporta le conclusioni concordate tra i partecipanti ai lavori, vengono quindi descritte due metodologie distinte concernenti i criteri per la ponderazione esperta di alcuni fattori che, a giudizio del Sottogruppo Acque dolci, concorrono alla valutazione della valenza "ecologico - scientifica" e di "praticità - fruibilità" di batterie di saggi ecotossicologici, in funzione del tipo di ambiente e della applicazione.

Sulla base dei criteri di valutazione identificati, si ritiene possibile giungere ad una valutazione obiettiva della validità scientifica e pratica di una batteria di saggi di ecotossicità, reale o ipotetica, mediante l'opportuna ponderazione di numerosi parametri che caratterizzano i possibili saggi biologici.

Per una corretta applicazione è necessario effettuare separatamente due tipi di calcoli: il primo consente di calcolare una "rilevanza scientifica", il secondo una rilevanza pratica". La ponderazione "scientifica" viene proposta come utile strumento per valutare l'attendibilità di una batteria di saggi ecotossicologici da applicare per ricerche e approfondimenti sito - specifici; la ponderazione alternativa "pratica" privilegia un approccio per un uso di routine. Il confronto sistematico di entrambe le ponderazioni indica, quindi, quanto la rilevanza scientifica penalizza la praticità o, in alternativa, quanto la praticità fa perdere in rilevanza. Combinandole assieme, si ha infine una valutazione "scientifico - pratica".

Ovviamente, la doppia ponderazione può essere anche utilizzata per ipotizzare diverse batterie alternative, per cercare la combinazione che massimizza sia la rilevanza che la praticità, nell'ottica di cercare un compromesso che aumenti la rilevanza scientifica, senza penalizzare eccessivamente la rilevanza pratica.

### ***Parte 3 - Identificazione degli organismi ed endpoint***

Sulla base dei criteri identificati nella Parte 1, è stata esaminata criticamente la bibliografia esistente, nonché le esperienze originali di ricerca dei componenti del gruppo, per arrivare ad identificare e proporre, nell'ambito dei diversi gruppi di organismi, i saggi ecotossicologici che rispecchiano i requisiti per una loro potenziale inclusione in batterie per acque interne e relativi sedimenti.

A tale scopo, per ciascun saggio viene identificato il tipo di prova (secondo la classificazione della Parte 1), l'organismo, la matrice utilizzata, l'endpoint, la durata dell'esposizione, l'obiettivo per il quale può essere proposto ed il riferimento bibliografico per il protocollo metodologico.

Quale ulteriore elemento di giudizio, per ciascuno dei saggi proposti vengono inoltre attribuiti i fattori di ponderazione necessari per valutare obiettivamente la valenza scientifica e pratica delle batterie che teoricamente possono essere costituite combinando opportunamente i saggi di organismi appartenenti a diversi livelli trofici. I criteri ed i fattori numerici di ponderazione sono stati dettagliatamente discussi nella Parte 2 del documento.

### ***Parte 4 - Composizione e valutazione delle batterie***

Sulla base delle valutazioni espresse dai membri del Sottogruppo Acque dolci, ed in particolare dei fattori di ponderazione attribuiti ai singoli saggi ecotossicologici basati su organismi appartenenti a diversi livelli trofici (Parte 3), è stato possibile applicare il metodo descritto nella Parte 2 per valutare obiettivamente la valenza scientifica e pratica delle batterie che teoricamente possono essere costituite per uno studio delle acque interne e dei relativi sedimenti.

Sono state quindi ipotizzate e confrontate diverse tipologie di batterie, ciascuna delle quali composte da un minimo di 3 saggi ecotossicologici, per ciascuna delle applicazioni possibili identificate nella Parte 1.

Le combinazioni illustrate rappresentano solo alcune di quelle possibili, scelte in modo tale da massimizzare la varietà di organismi ed endpoint. Quando, per lo stesso tipo di saggio, esistono delle alternative, generalmente viene preferito il saggio con il punteggio più elevato di valenza ecologica e/o pratica.

### ***Parte 5 - Scale di tossicità e indici integrati***

A conclusione del lavoro, è stata esplorata la possibilità di stabilire una scala di tossicità da applicare ai saggi ecotossicologici che compongono una batteria, indipendentemente dal loro numero e tipo, e di formulare, se possibile, un indice sintetico che cumuli i giudizi indipendentemente espressi sulla base dei singoli saggi di ecotossicità che compongono una batteria.

Innanzitutto, va ricordato che il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, predisposto dal Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e recante Norme in materia ambientale, nell'Allegato 5 (Limiti di emissione degli scarichi idrici) alla parte Terza, Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche, dispone che per la valutazione dello stato ecologico sono obbligatori i saggi di tossicità acuta e che "in caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il caso peggiore".

L'approccio ha una ovvia limitazione: la scelta automatica del caso peggiore, che è estremamente conservativa e non consente nemmeno un giudizio esperto basato sul weight of evidence. Sarebbe invece auspicabile utilizzare un indice che consenta di integrare le informazioni ottenute con i singoli saggi, tenendo conto del tipo di tossicità rilevata, e che permetta di mediare tra risultati spesso discordanti ed a volte anche contraddittori: non è infrequente, infatti, osservare che il risultato di un saggio indichi assenza di tossicità, mentre altri saggi rilevino una tossicità di grado diverso.

L'indice proposto prevede di applicare gli appropriati fattori di ponderazione, per ciascuno dei saggi che costituiscono una batteria, ai seguenti parametri:

- Severità della risposta, in funzione del tipo di effetto misurato;
- Grado della risposta, in percentuale rispetto al valore medio del rispettivo controllo negativo, in funzione della significatività statistica;
- Variabilità della risposta, espressa dal coefficiente di variazione tra repliche dello stesso saggio.

Ovviamente, severità, risposta e variabilità sono caratteristiche del saggio per lo specifico campione.

L'indice considera inoltre il numero di endpoint considerati complessivamente nella batteria e la consistenza, che esprime il grado di accordo tra i vari endpoint: è alta se tutti i test concordano, ed è quindi alta anche la fiducia di poter identificare una situazione di rischio; la consistenza però diminuisce se i risultati sono contraddittori o conflittuali, e quindi diminuisce anche la fiducia di identificare correttamente il grado di rischio.

Infine, viene introdotto anche un correttivo per le matrici sulle quali vengono condotti i saggi e che hanno una diversa rilevanza ai fini dell'interpretazione dei risultati di una batteria.

### ***Conclusioni***

Con questo documento il Sottogruppo Acque dolci ritiene di aver assolto il compito che gli era stato affidato, identificando i criteri di composizione di batterie di saggi biologici che consentano di effettuare una valutazione ecotossicologica delle acque interne e dei relativi sedimenti in funzione delle diverse tipologie delle indagini.

Va precisato che le indicazioni emerse da questo Sottogruppo Acque dolci non hanno e non possono avere validità di protocolli vincolanti. Solo una eventuale adozione da parte delle Autorità competenti (ISPRA, UNICHIM, altre) conferirà loro la necessaria ufficialità.

Tuttavia, il documento fornisce elementi sufficienti per "giudicare", e quindi confrontare in maniera obiettiva, attraverso la ponderazione esperta di alcuni fattori, la valenza di qualunque batteria di saggi biologici, in termini di rappresentatività ecologica e/o praticità di realizzazione e/o applicazione.

Fornisce inoltre numerosi esempi di batterie che potrebbero essere utilizzate per indagini ecotossicologiche specifiche per determinati ambienti e per diversi obiettivi (salvaguardia degli ambienti, monitoraggio di routine, recupero di ambienti contaminati, ecc.).

Infine, l'indice sintetico elaborato consente di integrare i risultati ottenuti con una batteria di saggi ecotossicologici e può essere applicato a qualsiasi batteria, indipendentemente dal numero e tipo di endpoint considerati, permettendo di calcolare in modo obiettivo tossicità e potenziale rischio di un campione, espressi in una scala arbitraria ma che corrisponde ad un "giudizio esperto" condiviso dai partecipanti al Sottogruppo Acque dolci.

Ovviamente, questo indice va inteso solo come uno strumento di lavoro e non pretende di sostituirsi alla valutazione critica espressa dall'utilizzatore.

Le diverse parti del documento "Batterie per saggi ecotossicologici su acque interne" verranno pubblicate sul sito web di ISPRA.

In funzione degli ulteriori contributi e dei commenti dei lettori, il Sottogruppo Acque dolci si assume fin da ora l'impegno ad aggiornare periodicamente il documento; è infatti prevedibile che, in futuro, alcuni saggi possano rimpiazzare o affiancare i saggi attualmente inseriti nelle batterie, se in tal modo dovesse significativamente migliorare la valenza scientifica e/o pratica delle batterie proposte.

## *Ringraziamenti*

Con questa presentazione si coglie l'occasione di ringraziare i membri del Sottogruppo Acque dolci, che hanno profuso il loro impegno per consentire la redazione del documento qui brevemente illustrato:

Fabrizio Bandini, ARPA Emilia Romagna- Ravenna  
Franco Baroncelli, ECOTOX srl - Pregnana Milanese  
Andrea Buffagni, CNR IRSA, Brugherio  
Raffaella Cardente, ECOTOX srl - Pregnana Milanese  
Giuseppe Crosa, UNI Insubria, Varese  
Enrico Dallara, Sasol Olefins and Surfactants, Parma  
Marco Faimali, CNR-ISMAR, Genova  
Roberto Farina, ENEA, Bologna  
Marco Francese, SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park,Trieste  
Paola Frisenda, SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park,Trieste  
Elisabetta Galli, ARPA Lombardia, Cremona  
Cristina Giarei, Eurofins, Milano  
Tristano Leoni, ARPA Marche, Macerata  
Maria Rita Minciardi, ENEA, Saluggia  
David Pellegrini, ISPRA - Livorno  
Giovanni Sansone, UNI Federico II, Napoli  
Alfonso Sbalchiero, ISPRA - Roma  
Giancarlo Sbrilli, ARPAT - Toscana, Grosseto  
Gabriella Scanu, Ministero Ambiente, Roma  
Annamaria Zoppini, CNR IRSA, Roma



# STUDIO INTEGRATO SULLO STATO QUALITATIVO DEGLI AMBIENTI DI TRANSIZIONE. CASO DI STUDIO: LA PALUDE DI CONA (LAGUNA DI VENEZIA, ITALIA).

di M. Botter<sup>a</sup>\*, F. Acri<sup>b</sup>, V. Piazza<sup>b</sup>, E. Loverso<sup>b</sup>, F. Garaventa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Venezia, Italy – m.botter@ve.ismar.cnr.it, f.acri@ve.ismar.cnr.it, francesca.garaventa@ismar.cnr.it

<sup>b</sup>Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Genova, Italy – veronica.piazza@ismar.cnr.it, ezio.loverso@gmail.com

---

**Abstract** - Nel 2012 è stata effettuata in Palude di Cona (Laguna di Venezia) un'indagine integrata della qualità che ha previsto la determinazione delle concentrazioni di metalli pesanti nel sedimento e nell'acqua interstiziale e l'analisi di tossicità associata al sedimento. I risultati indicano come l'approccio integrato chimico ed ecotossicologico sia in grado di fornire un quadro più completo dello stato ecologico di un corpo idrico.

Parole chiave: ambienti di transizione, saggi ecotossicologici, Laguna di Venezia

## *Introduzione*

Lo stato di salute degli ambienti acquatici europei, comprese le acque di transizione come le lagune costiere, è disciplinato dalla Direttiva Quadro sulle Acque (2000/60 EU, WFD), che richiede la classificazione della qualità ambientale dei corpi idrici al fine di raggiungere la condizione di "Buono" stato ecologico entro il 2015.

Alla base della WFD vi è la necessità di impostare, secondo un approccio integrato, le attività di monitoraggio e di controllo volte alla tutela delle acque. In particolare, è necessario considerare i corpi idrici come sistemi complessi, costituiti sia da componenti abiotiche (acqua e sedimenti) sia da componenti biotiche (organismi acquatici e terrestri) che si trovano in uno stato di equilibrio dinamico.

In quest'ottica, la direttiva prevede una valutazione dello stato ambientale delle diverse tipologie di sistemi acquatici basata non solo sulle analisi chimiche e fisiche del comparto abiotico, ma anche sulle risposte da parte di organismi target esposti alle diverse matrici ambientali ed al potenziale di bioaccumulo degli inquinanti negli organismi

In tale contesto, il presente lavoro descrive una serie di indagini effettuate su sedimenti prelevati in un'area di transizione: la Palude di Cona, situata all'interno della Laguna di Venezia.

L'indagine ha previsto la caratterizzazione analitica degli inquinanti nei sedimenti e gli effetti che questi hanno su organismi marini appartenenti a diversi livelli trofici: nauplii di *Amphibalanus amphitrite* e microalghe *Dunaliella tertiolecta*.

## *Materiali e metodi*

### *Area di studio e piano di campionamento*

La Palude di Cona (Fig. 1) è un'area di transizione caratterizzata da morfologia complessa e dall'influenza del fiume Dese, che è uno dei principali ingressi di acqua dolce in Laguna. La Palude di Cona è lunga 3.2 km, ha larghezza variabile tra 0.9 e 1.7 km e profondità media di circa 50 cm sul l.m.m.

L'idrodinamica complessa e i processi fisico-chimici che interessano la Palude di Cona, rendono quest'area un interessante laboratorio naturale per studiare processi di trasferimento e accumulo di sostanze inquinanti in laguna.

I campioni di sedimento sono stati prelevati nel Gennaio 2012 in 3 siti all'interno della Palude in prossimità di bocca Carozza e dello sbocco in laguna recentemente realizzato della deviazione del canale di Santa Maria (Fig. 1). I campioni destinati all'analisi chimica sono stati prelevati utilizzando un carotatore del tipo a pistone con liner in plexiglas di lunghezza pari a 50 cm e diametro di 64 mm. I campioni destinati alla caratterizzazione ecotossicologica sono stati prelevati utilizzando un box-corer; la frazione di sedimento considerata è stata quella 0-5 cm.

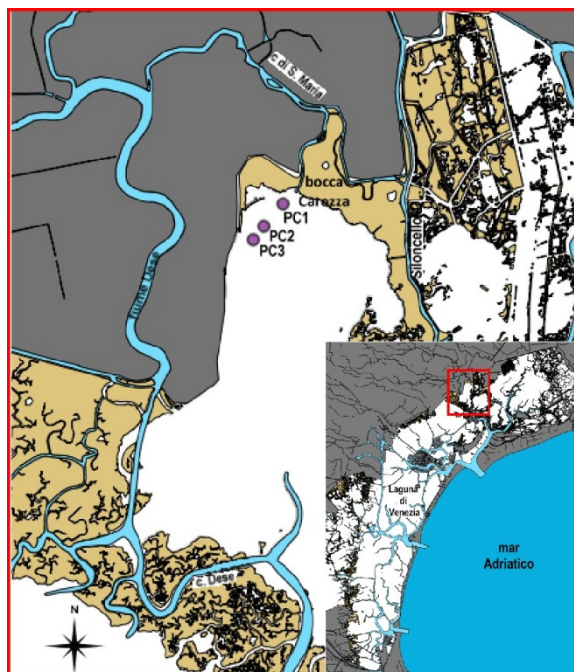


Figura 1. Ubicazione dei siti di campionamento nella Palude di Cona.

#### *Caratterizzazione dei sedimenti ed analisi chimica*

Al fine di evidenziare al meglio la struttura e la stratificazione delle carote di sedimento e potere così individuare gli strati di maggiore interesse lungo il profilo verticale sui quali effettuare la caratterizzazione chimica, esse sono state sottoposte ad analisi in Tomografia Assiale Computerizzata (TAC).

Le carote di sedimento sono state tagliate longitudinalmente e sub-campionate alle profondità di interesse. I campioni ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della bulk density e alla determinazione di granulometria e metalli pesanti.

La determinazione della granulometria è stata eseguita con un analizzatore a luce laser Microtrac 9320 X100-FRA (Leeds & Northrup, USA), che fornisce la percentuale volumetrica di particelle in 50 classi di diametro, nell'intervallo 0.1 - 740  $\mu$ m.

L'analisi della concentrazione di metalli pesanti, incluso As ed escluso Hg, è stata eseguita in spettrometria ICP/OES (Optima 2100DV, Perkin Elmer, USA) dopo trattamento di digestione con acido nitrico concentrato assistita in microonde (Metodo EPA 3051+200.7). Nel caso del mercurio, invece, la determinazione analitica del campione è stata effettuata in spettroscopia di assorbimento atomico (Perkin Elmer, FIAS 400, AAnalyst 100, USA) a vapori freddi (Metodo EPA 3051+245.1).

#### *Caratterizzazione eco tossicologica*

I test ecotossicologici sono stati effettuati utilizzando nauplii II stadio del crostaceo *Amphibalanus amphitrite* e microalghe *Dunaliella tertiolecta*. I crostacei sono stati esposti al sedimento in toto ed agli elutriati ottenuti secondo il metodo EPA, 2001. L'esposizione ai sedimenti in toto è avvenuta secondo il metodo EPA, 1996 opportunamente modificato. Le microalghe sono state esposte unicamente all'elutriato. Gli end-point misurati nel test di tossicità con *A. amphitrite* sono stati la mortalità come acuto e l'alterazione della velocità del nuoto come sub-letale (Faimali et al, 2006). L'esposizione di *D. tertiolecta* agli elutriati è avvenuta secondo il metodo ISO 10253 (2000). Gli elutriati sono stati analizzati per determinare il contenuto di metalli seguendo la metodologia descritta in precedenza.

#### **Risultati**

##### *Caratterizzazione dei sedimenti ed analisi chimica*

I risultati dell'analisi TAC hanno permesso di effettuare dei sub-campionamenti lungo la carota di sedimento.

I risultati delle analisi chimiche, effettuati sui diversi sub-campioni sono riassunti in Tabella 1.

*Tabella 1. Dati statistici della distribuzione dei valori di concentrazione dei metalli pesanti: media, deviazione standard  $\sigma$ , massimo, minimo, coefficiente di variazione CV% [ $100 * \sigma / media$ ], p.s.=peso secco*

La maggior variabilità dei valori di concentrazione si osserva nel caso di Cd, Hg, As e Zn. Per tutti i metalli si osserva una diminuzione delle concentrazioni dagli strati più profondi verso la superficie.

Al fine di classificare i sedimenti e di inferire sul loro livello di contaminazione e la relativa pericolosità ambientale, i valori analitici acquisiti sono stati confrontati con due tipologie di indici guida.

Un primo confronto è stato realizzato con la coppia di SQGs adottata a livello internazionale che è denominata ERL ("Effects-Range Low") ed ERM ("Effects-Range Medium") (Long et al., 1995). Il secondo indice riguarda gli standard di qualità ambientale (EQS) per i sedimenti delle acque marine e di transizione ed è stato stabilito dal Decreto Legge 219 del 2010.

La Tabella 2 mostra la percentuale di campioni, in base alle concentrazioni dei diversi metalli, che ricadono in ognuna delle categorie qualitative individuate secondo gli indici derivati dalle linee guida per la qualità dei sedimenti.

Tabella 2. Distribuzione percentuale dei campioni nelle categorie individuate secondo i valori standard ERL, ERM e D.L. 219/2010.

% di campioni	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
< ERL	0	100	100	13	7	13	100	20
ERL - ERM	100	0	0	87	87	87	0	80
> ERM	0	0	0	0	7	0	0	0
> Std. Q. 219/10	67	0	0		80	20	60	

In Tabella 3 vengono riportati i risultati delle analisi chimiche sui campioni relativi ai primi 5 cm di sedimento.

Tabella 3. Valori di concentrazione dei metalli pesanti nei campioni di sedimento superficiale (0 - 5 cm)

campioni di sedimento sup (0 - 5 cm)	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
	<i>mg kg<sup>-1</sup>, p.s.</i>									
PC1	14.7	0.02	19.9	33.5	21537	0.24	703	18.2	22.2	133
PC2	11.7	0.12	29.2	43.7	26720	0.46	766	25.9	29.2	203
PC3	10.4	0.09	31.5	41.7	27147	0.58	574	27.7	31.7	213

#### Caratterizzazione ecotossicologica

I risultati dei test di tossicità ottenuti esponendo nauplii II stadio di *A. amphitrite* e microalghe *D. tertiolecta* ad elutriati e sedimento tal quale sono riportati in Tabella 4 e 5. Le percentuali di mortalità in *A. amphitrite* non superano mai il 20% indicando livelli di tossicità acuta pressoché inesistenti. Anche l'end-point comportamentale non evidenzia effetti tossici significativi.

Lo stesso indicazione di assenza di tossicità associata è messa in evidenza anche dai risultati ottenuti con le alghe. PC1 e PC2 causano una leggera inibizione della crescita mentre PC3 ha un lieve effetto ormetico.

Per nessun end-point è stato possibile calcolare i valori di LC50 ed EC50 in quanto non è mai stata superata la percentuale di effetto del 50%.

Tab. 4: Percentuali di mortalità ed alterazione del nuoto di nauplii di *A. amphitrite* dopo 24h di esposizione ad elutriato tal quale e sedimento in toto

<i>Amphibalanus amphitrite</i>						
Elutriato - 24 h						
	PC1		PC2		PC3	
	% Mort.	% Alt. nuoto	% Mort.	%Alt. Nuoto	% Mort.	%Alt. Nuoto
Media	0.00	-20.39	0.00	-9.02	0.00	15.94
es	0.00	4.89	0.00	6.22	0.00	8.04
Sed. In toto 24 h						

Media	1.96	-14.88	11.27	-2.01	19.02	-25.68
es	1.96	3.08	2.70	2.86	3.01	12.38

Tab. 5: Percentuale di alterazione della crescita di *D. tertiolecta* esposta ad elutriato tal quale

<i>Dunaliella tertiolecta</i> -% alterazione crescita algale			
Elutriato - 24 h			
	PC1	PC2	PC3
Media	-26.88	20.96	-31.19
es	3.44	16.24	9.03

In Tabella 6 vengono riportati i risultati delle analisi chimiche sui campioni di sedimento in toto ed di elutriato tal quale a cui sono stati esposti gli organismi. Le concentrazioni di Cd e Pb sono risultate sempre al di sotto dei limiti di rilevabilità ( $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ ), le concentrazioni di mercurio sono molto basse in tutti i campioni ( $<0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Per quanto concerne il sedimento in toto, nel campione PC3 si riscontrano concentrazioni molto maggiori di As, Cu, Fe, Mn e Ni rispetto agli altri due campioni. I campioni di elutriato presentano concentrazioni generalmente inferiori rispetto ai campioni di sedimento. In termini relativi, si riscontrano concentrazioni maggiori di un ordine di grandezza di Cu in PC2, di Cr e Fe in PC3, di Mn e Ni in PC1.

Tabella 6. Valori di concentrazione dei metalli pesanti nei campioni di sedimento in toto ed elutriato usati nei test tossicologici

		As	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Zn
		$\mu\text{g L}^{-1}$							
sedimento in toto	PC1	<0.01	0.45	8.10	7.95	0.02	0.45	26.61	130.3
	PC2	<0.01	0.52	8.86	4.77	0.07	1.17	1.17	130.8
	PC3	3.38	1.38	31.02	322.9	0.09	1455	469.5	128.3
elutriato tal quale	PC1	2.34	0.04	7.51	10.24	<0.01	11.80	58.61	1.53
	PC2	3.17	0.09	54.28	12.98	0.03	1.83	4.40	0.30
	PC3	0.88	0.49	2.56	115.0	<0.01	6.05	2.38	3.02

### Discussione e conclusioni

Sulla base dei valori limite ERL ed ERM, il mercurio è l'unico analita che supera il valore di ERM ( $0.71 \text{ mg/kg ps}$ ) in un solo caso (PC2-E). Le concentrazioni di arsenico eccedono il limite ERL nella totalità dei casi, rame, mercurio, nichel e zinco in quasi tutti i campioni (12 o 13), mentre cadmio, cromo e piombo non eccedono mai il valore di ERL.

I campioni che sulla base delle Sediment Quality Guidelines (SQGs) risultano potenzialmente meno tossici sono i campioni superficiali (0-10 cm) del sito PC1.

Le concentrazioni di Hg, As, Pb e Ni sono superiori allo standard di qualità fissato nel Decreto Legge 219/2010 nella maggioranza dei casi (12, 10, 9 e 3 campioni, rispettivamente).

Le SQGs riguardano gli elementi minori (o "in traccia") e non quelli maggiori (Fe, Mn). Per questi metalli, nello strato superficiale di sedimento (0 - 5 cm), si riscontrano valori di concentrazione al di sopra della media lagunare (Zonta et al., 2011) e confrontabili con i valori massimi rilevati nei bassofondali antistanti la zona industriale di Porto Marghera (Zonta et al., 2007).

I risultati dei test ecotossicologici hanno evidenziato l'assenza di un effetto tossico significativo sia in *A. amphitrite* sia in *D. tertiolecta*. Dai dati di tossicità ottenuti esponendo *D. tertiolecta* agli elutriati è possibile osservare una alterazione della crescita algale che però non raggiunge mai livelli tali da poter calcolare un valore di EC50. Le alterazioni osservate (sia come inibizione che come fenomeni di ormesi, PC2) potrebbero essere associate, ad esempio in PC2, alla presenza di rame. Infatti, nell'elutriato di tale campione esso è pari a 50 µgL<sup>-1</sup>, valore che è circa la metà dell'EC50 verso la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Cid et al., 1995). L'effetto del Cu potrebbe però essere mitigato dalla presenza di manganese (e di ferro) di cui questi sedimenti sono particolarmente ricchi e che, come noto, è in grado di mitigare la tossicità del rame (Stauber and Florence, 1985). Infine, risulta particolarmente interessante e degna di futuri approfondimenti, l'osservazione della variazione di concentrazione dei composti analizzati nelle diverse matrici (sedimento, elutriato ed acqua di esposizione al sedimento in toto). Nel caso dei sedimenti oggetto di indagine i valori mediamente bassi di concentrazioni e gli effetti pressoché nulli di tossicità non permettono di effettuare analisi statistiche mirate, ma in futuro, sarebbe interessante approfondire questo aspetto soprattutto nell'ottica della stima della reale biodisponibilità degli inquinanti.

### **Bibliografia**

- Cid A.; Herrero C.; Torres E.; Abalde J. (1995) Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. 31(2): 165-174
- EPA (1994). Method 245.1 Determination of mercury in water by cold vapour atomic absorption spectrometry. United States environmental protection monitoring systems laboratory office of research and development EPA/600/R-94/111
- EPA (1994). Method 200.7. Determination of metals and trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. United States environmental protection monitoring systems laboratory office of research and development EPA-600/4-82-055
- EPA (1996) Ecological effects Test guidelines - OPPTS 850.1740 Whole sediment Acute toxicity Invertebrate, Marine. EPA 712-C-96-355. April 1996, Public Draft. Pag 1-12.
- EPA (2001) Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: technical manual. United States environmental protection office of water 4305, EPA-823-F-01-023
- EPA (2007) Method 3051A Microwave-Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils, and Oils SW-846
- Faimali M., Garaventa F., Piazza V., Magillo F., Greco G., Corrà C., Giacco E., Gallus L., Falugi C. (2006) Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. Marine Biology, 149: 87-96.
- ISO 10253 (2000) Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.

Stauber, J.L., Florence T.M. (1985) Interactions of copper and manganese: a mechanism by which manganese alleviates copper toxicity to the marine diatom, *Nitzschia closterium* (Ehrenberg). *Aquat. Toxic.* 7, 241-254

Zonta R., Botter M., Cassin D., Pini R., Zaggia L. (2007) Sediment chemical contamination of a shallow water area close to the industrial zone of Porto Marghera (Venice Lagoon, Italy). *Marine Pollution Bulletin* 55, 529-542.

Zonta R., Botter M., Cassin D., Pesce A., Rispondo A. (2011) Progetto QSEV: Qualità dei sedimenti della laguna di Venezia. Indagine per l'aggiornamento e l'integrazione dei dati sulla qualità dei sedimenti lagunari. Rapporto Tecnico Finale, CNR-ISMAR, 77pp.

# EFFETTI INDOTTI SU *V. FISCHERI*, *B. PLICATILIS* E *P. TRICORNUTUM* DALL'ESPOSIZIONE A MISCELE DI SOSTANZE AD AZIONE TOSSICA IN SOLUZIONI DI ACQUA DI MARE

di M. Renzi<sup>\*1,2</sup>, S. Fantoni<sup>2</sup>, A. Giovani<sup>3</sup>, S.E. Focardi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro ricerche di Ecologia, pesca ed acquacoltura, Polo Universitario Grossetano, via Lungolago dei pescatori s.n. 58015 Orbetello (GR)

<sup>2</sup>Consorzio Nazionale Interuniversitario per le Scienze del Mare (CoNISMa), Via Isonzo 32, 00198, Roma.

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena, via Mattioli 4, 53100, Siena.

---

**Abstract** -. In questo lavoro sono state studiate le relazioni dose-effetto di contaminanti ambientali organici ed inorganici e di loro miscele in acqua di mare naturale su tre specie marine appartenenti a diversi livelli trofici [*V. fischeri*, *B. plicatilis*, *P. tricornutum*] utilizzando indicatori di stress sia previsti dalle linee guida ministeriali che non inclusi in esse con lo scopo di: i) tracciare un quadro completo degli effetti che le sostanze tossiche hanno sugli organismi marini nel loro medium naturale sia come composti singoli che come miscele; ii) valutare l'applicabilità/sensibilità di risposta degli indicatori di stress precoce proposti.

Parole chiave: test ecotossicologici, miscele, *V. fischeri*, *B. plicatilis*, *P. tricornutum*

## Introduzione

Le linee guida del Ministero dell'ambiente per il controllo della qualità delle acque marine riconoscono ai saggi ecotossicologici un ruolo chiave nella stima della qualità ambientale e del rischio associato a fenomeni di inquinamento [1]. Tuttavia la ricerca in questo settore necessita di essere implementata non essendo disponibili in letteratura dati esaustivi riguardo al comportamento tossico di miscele di specie metalliche e composti organici in soluzioni di acqua di mare naturale. Questo studio si è proposto di valutare le relazioni dose-effetto ottenute dall'esposizione di alcune specie appartenenti a tre diversi livelli trofici, proposte dalle linee guida ministeriali: *Vibrio fischeri*, *Brachionus plicatilis* e *Phaeodactylum tricornutum* in risposta a soluzioni singole di diciassette sostanze di interesse ambientale (macronutrienti, elementi in tracce, tensioattivi, pesticidi) e loro miscele ottenute utilizzando l'acqua di mare naturale come solvente. La ricerca ha previsto la determinazione della concentrazione dell'effetto mediano EC50 [*V. fischeri*, *P. tricornutum*] e della concentrazione letale LC50, LC20, LC10 [*B. plicatilis*] ed una valutazione relativa alla diversa sensibilità specie-specifica nei confronti delle soluzioni tossiche testate. Si è valutato anche l'effetto ottenuto in risposta ad un'esposizione congiunta a tossici e nutrienti. Infine, nel caso della specie algale, oltre all'inibizione del tasso di crescita, si è stimato l'effetto indotto sui pigmenti fotosintetici e sull'indice di feofitizzazione.



## **Materiali e metodi**

Il modello logico adottato per la sperimentazione è di tipo nested replicato ed ha consentito di isolare, per ogni descrittore di stress selezionato, la varianza associata ai fattori:

- esposizione a singoli tossici/miscele di essi;
- componente specie-specifica della risposta.

Utilizzando l'acqua di mare naturale come solvente (AMN) sono state sottoposte a prova 17 soluzioni di sostanze singole e 13 miscele di composti (Mix).

I singoli composti testati sono stati:

- Macronutrienti (Ortofosfati, TP);
- Elementi in tracce (Hg, Be, Ba, Mn, Ni, Co, Mo, V, Se, Ir);
- Tensioattivi reattivi al blu di metilene (MBAS);
- Pesticidi (Chlorothalonil, Pendimethalin, Trifluralin, Chlorthalidimethyl, 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid).

Sulla base di un'attenta revisione bibliografica sono stati selezionati protocolli standard di esposizione [2,3,4] che hanno previsto la determinazione di:

- concentrazione di effetto mediano (EC50) dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione per *V. fischeri*;
- concentrazione di effetto mediano (EC50) dopo 72 ore di incubazione per *P. tricornutum*;
- concentrazione di letalità mediana sul 50% (LC50), 20% (LC20) e 10% (LC10) della popolazione dopo 48 ore di esposizione per *B. plicatilis*.

Sono stati, inoltre determinati sulla specie algale, le concentrazioni di clorofilla a (Chl-a), pigmenti accessori (Chl-cx) rispetto al controllo non esposto ai tossici e l'indice di feofitizzazione (Phe) come indicato dalla letteratura consultata [5].

L'AMN utilizzata come solvente è stata prelevata in una zona ad elevata qualità ambientale (località Due Pini, M. Argentario, GR) ed analizzata chimicamente per escludere la presenza delle molecole di interesse specifico a concentrazioni misurabili con i metodi attualmente disponibili. L'AMN è stata, inoltre, testata come controllo sperimentale in blank durante ogni saggio ecotossicologico effettuato.

## **Risultati e discussione**

I risultati ottenuti dallo studio condotto hanno consentito l'acquisizione delle dosi di effetto per le 17 specie chimiche testate e per le loro miscele.

Si sintetizzano a seguito i risultati di maggiore rilievo per ognuna delle tre specie:

- *V. fischeri*. In linea generale, si osserva assenza di tossicità per quanto riguarda l'esposizione alle dosi massime testate delle specie Mn (2,5 mgL<sup>-1</sup>), Ni (2,5 mgL<sup>-1</sup>), MBAS (3,3 mgL<sup>-1</sup>) e 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (1,0 gL<sup>-1</sup>) solubilizzate in acqua di mare naturale. A queste dosi la specie mostra ormesi. L'ormesi, fenomeno relativamente comune in natura, si esplica attraverso una risposta definita bifasica che implica un incremento della funzione metabolica osservata a certe dosi, normalmente medio-basse, e un suo decremento a alte dosi. L'incremento delle attività vitali in risposta all'esposizione è generalmente spiegato come un'accelerazione transitoria

del metabolismo dell'organismo nel tentativo di liberarsi di sostanze altrimenti dannose. La specie risponde a tutti gli altri composti tossici testate e, nel caso degli elementi in tracce, presenta un'elevata sensibilità nei confronti del Hg seguita in ordine decrescente da Co, Ir, Se, Mo e V. Il Be mostra EC50 a 30 minuti di esposizione pari a 8,75 mgL<sup>-1</sup> mentre il Ba evidenzia EC50 pari a 7,01 mgL<sup>-1</sup>. Per quanto riguarda i pesticidi, ad eccezione del 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid, si osserva una sensibilità compresa tra 583 mgL<sup>-1</sup> e 679 mgL<sup>-1</sup>. Questo risultato è probabilmente attribuibile alla bassa solubilità di questi composti in acqua di mare naturale. L'aggiunta del tensioattivo raddoppia la sensibilità con un EC50 a 30 minuti che passa da una dose di 83,9% della soluzione tossica di partenza a valori compresi tra 29,1% e 55,9% della soluzione tossica in aggiunta di tensioattivo. Si è osservato, infine, nonostante la minore sensibilità una maggiore rapidità di azione tossica da parte dei composti organici (pesticidi) rispetto agli elementi in tracce. In fatti l'EC50 diminuisce notevolmente in funzione del tempo di osservazione nel caso degli elementi in tracce caratterizzati da tempi di risposta all'esposizione più lunghi mentre resta pressoché costante nel tempo per i pesticidi mostrando dopo 30 minuti di esposizione un effetto del tutto comparabile a quello evidenziato dopo soli 5 minuti.

- *B. plicatilis*. Si osserva assenza di tossicità a 48 ore di esposizione alle dosi massime testate di Mn (2,5 mgL<sup>-1</sup>), Ni (2,5 mgL<sup>-1</sup>) e 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (1,0 gL<sup>-1</sup>). I tensioattivi MBAS mostrano, al contrario, un effetto tossico mediano sul 50% della popolazione esposta (LC50) alla dose di 1,65 mgL<sup>-1</sup>. In linea generale questa specie mostra una maggiore sensibilità ai composti organici (pesticidi e tensioattivi) che agli elementi in tracce.
- *P. tricorutum*. Non si registrano effetti tossici evidenti sulla specie algale dopo 72 ore di esposizione alle dosi massime testate di Ni (2,5 mgL<sup>-1</sup>), tuttavia si osserva induzione del complesso fotosintetico (Chl-a) associato alla diminuzione di Chl-cx e all'incremento del rapporto di feofitizzazione rispetto ai controlli. Anche questa specie mostra una maggiore sensibilità ai composti organici (pesticidi e tensioattivi) che agli elementi in tracce. Per quanto riguarda MBAS e 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid si osserva tossicità in *P. tricorutum* alle dosi rispettivamente di 0,54 mgL<sup>-1</sup> e 549 mgL<sup>-1</sup>. L'effetto superiore di MBAS rispetto al 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid è attribuibile, anche in questa specie, alla diversa solubilità in acqua delle sostanze e non alla maggiore tossicità intrinseca del tensioattivo rispetto al pesticida. Quanto supposto è dimostrato dalla risposta tossicologica della specie nei confronti della soluzioni multi-componente con e senza l'addizione di MBAS. L'esposizione in presenza di tensioattivo amplifica l'effetto dei pesticidi in quanto svolge un ruolo di solubilizzazione delle sostanze lipofile in acqua aumentandone, di fatto, la biodisponibilità per il bersaglio. In entrambi i casi, l'esposizione al tossico inibisce il complesso fotosintetico (Chl-a, Chl-cx) e raddoppia l'indice di feofitizzazione (Phe).
- Un dato interessante, nel caso della specie algale, emerge dal confronto tra le risposte ottenute dall'inibizione del tasso di crescita a 72 ore (indicatore di stress convenzionalmente utilizzato dalle linee guida ministeriali in Italia) con quelle ottenute dall'utilizzo di indicatori di stress fisiologico proposti dalla letteratura e già ampiamente standardizzati nel caso delle specie terrestri (i.e. licheni) quali i livelli di Chl-a, Chl-cx e Phe. I risultati ottenuti mostrano una maggiore sensibilità di risposta di questi ultimi rispetto all'inibizione del tasso di crescita algale.

- Un altro risultato di particolare interesse è dato dalle soluzioni multi-componente contenenti due sostanze tossiche ed il TP. La presenza di TP è in grado di mascherare la tossicità delle sostanze tossiche cui è aggiunto. Questo dato è attribuibile all'incremento dell'attività metabolica indotta dalla presenza di TP e stimolata da dosi sub-letali di tossici come forma auto-detossificante (ormesi indotta). Questo tipo di comportamento si registra sia nel caso di *V. fischeri* che nel caso di *P. tricornutum*. Interessante è notare che lo stress di esposizione si rileva chiaramente nel caso della specie algale considerando gli indici Chl-a, Chl-cx e Phe anche in presenza di TP. In questo caso, l'effetto tossico (inibizione del tasso di crescita) dovuto all'esposizione è mascherato dalla presenza del TP che stimola la replicazione cellulare. Tuttavia, un'analisi attenta del complesso fotosintetico rivela la presenza di una forte induzione della Chl-a e del Chl-cx associata ad elevati incrementi del Phe. Tale fenomeno, per la specie algale *P. tricornutum*, assume particolare significato nel contesto ambientale, infatti, la valutazione accoppiata dei livelli dei tre descrittori utilizzati in questo studio (Chl-a, Chl-cx, Phe) può essere in grado di discriminare anche solo in termini qualitativi (induzione/inibizione rispetto al controllo) l'effetto congiunto di nutrienti e sostanze tossiche.

### **Conclusioni**

La ricerca condotta ha permesso di definire le concentrazioni efficaci in acqua di mare naturale di una vasta gamma di sostanze tossiche e loro miscele. La presenza di tensioattivi in ambiente acquatico incrementa sinergicamente la tossicità di composti xenobiotici e non. I nutrienti possono mascherare l'effetto tossico (*V. fischeri* e *P. tricornutum*). Gli indici Chl-a, Chl-cx e Phe mostrano una sensibilità di risposta maggiore rispetto all'inibizione del tasso di crescita (*P. tricornutum*). Se i dati di questo studio saranno confermati, l'incremento mostrato da Phe in risposta all'esposizione ai contaminanti ambientali, potrebbe fornire un valido ed economico strumento nel monitoraggio di ecosistemi acquatici per discriminare possibili incrementi dei livelli di Chl-a dovuti a fenomeni di stress chimico sub-letale.

### **Bibliografia**

- [1] ISPRA Manuali e linee guida 67/2011. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre;  
 [2] Metodo Ecotox®, protocollo: Screening test e test di conferma, Microtox®;  
 [3] Metodo: ASTM Standard Guide E1440-91, protocollo: Marine Rotoxkit®;  
 [4] Metodo: UNI EN ISO 10253, protocollo: Marine Algaltoxkit®; [5] Ronen e Galum 1984. Environ. Exp. Botan. 24: 239-245.

# SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SULLE ACQUE DELL'AREA INTERESSATA DAL NAUFRAGIO DELLA NAVE CONCORDIA

di D. Pellegrini<sup>†</sup>, I. Buttino<sup>ab</sup>, S. Canepa<sup>a</sup>, D. Sartori<sup>†</sup>, L. Morroni<sup>†</sup>, Gioia Benedettini<sup>†</sup>, Rocchina Manzione<sup>e</sup>, Francesco Vigna Guidi<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Livorno, Italy

<sup>b</sup> Stazione Zoologica Anton Dohrn Napoli

<sup>c</sup> Agenzia regionale per la Protezione Ambientale della Toscana, Pisa, Italy - g.benedettini@arpat.toscana.it

---

**Abstract** -In relazione alle attività di controllo volte a monitorare nel tempo la situazione ambientale in prossimità del relitto della Costa Concordia ed a valutare un possibile rischio di inquinamento in un'area particolarmente sensibile e a rilevante vocazione naturalistica, la Struttura Tecnico-Scientifica ISPRA di Livorno ed ARPAT, hanno effettuato saggi eco-tossicologici su campioni di acqua prelevata in tre stazioni, P2, P4 e P6, quest'ultima a sud della secca de Le Scole (vedi carta allegata) è considerata punto di controllo. I saggi eco-tossicologici consistono nella esposizione di organismi marini alle matrici ambientali da valutare, in questo caso acqua, e forniscono indicazioni sulla tossicità di tali matrici indipendentemente dai composti chimici in essa rilevabili con specifiche tecniche analitiche.

Parole chiave: ecotossicologia, monitoraggio, acqua, alghe, batteri, riccio di mare

## **Introduzione**

Il 13/01/2012 la nave da crociera Costa Concordia ha urtato gli scogli a poche centinaia di metri dall'Isola del Giglio (GR); l'impatto ha provocato uno squarcio di 70 metri nello scafo che ha causato l'affondamento della nave. L'emergenza è stata gestita dal Commissario delegato dal Governo, il responsabile del Dipartimento della Protezione civile, coadiuvato da un Comitato tecnico scientifico di cui ARPAT è parte. Compito di ARPAT è l'attività di monitoraggio ambientale mirata a verificare l'eventuale fuoriuscita di carburante e di tutti gli altri possibili inquinanti presenti a bordo, secondo un piano di monitoraggio predisposto anche in collaborazione con ISPRA ed effettuato con il Poseidon, la nave oceanografica di ARPAT. Nel piano di monitoraggio è prevista l'effettuazione di saggi eco-tossicologici esponendo organismi appartenenti a tre differenti taxa: un'alga fitoplanctonica unicellulare *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyta), un echinoderma il riccio di mare *Paracentrotus lividus*, ed il batterio bioluminescente gram-negativo *Vibrio fischeri*. Tali organismi sono stati scelti sulla base della loro posizione filogenetica, della rilevanza ecologica e della diversa sensibilità ai contaminanti.

## **Materiali e metodi**

### *Piano di monitoraggio*

Il piano di monitoraggio è stato strutturato in tre livelli:

Livello 1 - Monitoraggio svolto nei pressi della nave (nella fase iniziale) su 5 punti: P1 - Centro nave lato dritta, P2 - Prua nave, P3 - Centro nave lato sinistra, P4 -

Poppa nave, P5 – Bianco riferimento 1 miglio a largo. Ha lo scopo di tenere in sorveglianza l'entità dell' inquinamento e la sua diffusione. Sono previste analisi chimico-fisiche di base tramite sonde e strumentazione da campo e prelievo di campioni con successiva analisi di laboratorio su altri parametri correlati alle sostanze che possono essere rilasciate o prodotte. In questa fase sono stati anche campionati alcuni punti all'interno della nave.

Livello 2 – Monitoraggio per valutazioni di breve e medio periodo di danno ambientale – Programma concordato fra ARPAT e ISPRA tramite battello oceanografico, con indagini chimiche ecotossicologiche, idromorfologiche e biologiche su colonna d'acqua, sedimento e biota, da effettuarsi nell'intorno del luogo di affondamento in punti da stabilire in corso d'indagine e frequenze variabili in funzione dei parametri controllati. Le stazioni interessate sono quelle riportate nella Fig. 1.

Livello 3 – Monitoraggio per valutazioni di lungo periodo - Monitoraggio svolto presso 5 stazioni della rete di monitoraggio regionale vicine alla zona affondamento con frequenze [al momento] previste dal programma 2012 e con profilo ampliato con parametri chimici pericolosi e elementi di qualità biologica. Le stazioni di monitoraggio "in osservazione" sono le seguenti: Porto Santo Stefano, Montecristo, Foce Bruna, Cala Forno, Elba Sud (Mola). Il monitoraggio ha lo scopo di valutare eventuali variazioni dello stato di qualità delle acque marino-costiere rispetto agli standard di qualità previsti dalla normativa vigente.

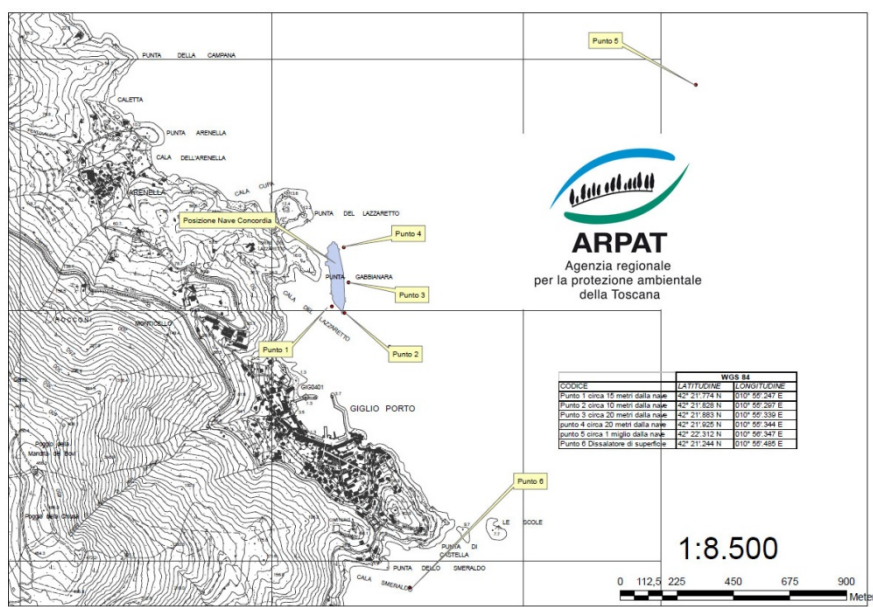


Fig. 1 - Punti di monitoraggio intorno al relitto; [fuori pianta: P6- Dissalatore a sud di Giglio Portopresso Cala Smeralda; P5 – Bianco 1 miglio a largo di Giglio Porto; P10 – Bianco a sud di Giglioporto presso Cala Caldane]

Riguardo la verifica della ecotossicità dei campioni di acqua superficiali, nelle prime quattro settimane almeno due volte alla settimana viene eseguita una batteria di almeno 3 specie composta da un batterio, un'alga e il riccio di mare, con prove di tossicità acuta e a più lungo termine, in grado di rispondere anche a lievi livelli di inquinamento.

Nei 12 mesi successivi, per l'ecotossicologia si proseguirà con almeno due saggi di screening.

*Test di tossicità acuta con batteri bioluminescenti (Vibrio fischeri) su matrice liquida - Metodo: APAT IRSA CNR 8030 Manuale 29/03: 2003*

Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di campioni utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri* dopo un tempo di contatto di 30 minuti con il campione in esame.

*Test di tossicità acuta con ALGHE*

*Phaeodactylum tricornutum* è un'alga monocellulare appartenente al gruppo delle Diatomee. La specie è eurialina e cosmopolita. Il principio del test consiste nell'esporre una coltura algale pura in fase di crescita esponenziale a concentrazioni note di campione, in condizioni fisico-chimiche standardizzate e con un definito e omogeneo apporto di nutrienti.

Al termine del periodo d'incubazione viene confrontata la crescita algale nel campione con quella del controllo. I saggi biologici sono stati eseguiti seguendo il protocollo UNI EN ISO (2006), con alcune modifiche specifiche.

*Test di tossicità acuta Riccio*

Test di spermiotossicità

Il saggio consiste nell'esporre un numero definito di gameti maschili per 1h ad una sostanza tossica o ad una matrice acquosa complessa di cui si vuole valutare la tossicità. Lo scopo è di valutare l'efficacia della fecondazione rispetto a un controllo negativo. Successivamente vengono aggiunte le uova e dopo 20 minuti il test viene bloccato con l'aggiunta di formalina. Il rapporto sperma:uova adottato è di 15000:1 con 1000 uova in 10 ml di soluzione test. Al termine delle prove vengono conteggiate le uova fecondate e calcolate le percentuali di fecondazione corrispondenti alle diverse diluizioni della matrice acquosa complessa testata.

Tutte le fasi del test descritte in seguito sono da considerarsi effettuate in parallelo, sia con acqua di mare ricostituita sia con acqua di mare naturale filtrata, in modo da valutare eventuali differenze nella risposta del saggio.

Test di embriotossicità

La fase vera e propria del test consiste nell'ottenere gli zigoti attraverso l'unione della sospensione spermatica (concentrazione desiderata) con la sospensione di uova in un rapporto spermatozoi:uova di 10:1. Lasciare il beaker a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  e aspettare almeno 20 min affinché possa avvenire la fecondazione delle uova.

Il saggio di embriotossicità viene eseguito esponendo 1 mL di soluzione di uova fecondate a 10 mL della soluzione test in cella termostatica al buio a  $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  per 72h.

Il numero degli embrioni nei 10ml della soluzione test è di circa 2000 (200/ml). Normalmente gli zigoti si sviluppano e raggiungono lo stadio larvale in 48h, ma il tempo di esposizione scelto per il test, garantisce che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio di larva (pluteo) nel controllo negativo.

Il test viene fissato con 1 ml di formalina concentrata tamponata (cappa E-series 120 CASARIN).

La stima della percentuale di plutei normali avviene contando 100 larve.

## **Risultati**

### *Vibrio fischeri*

Nella fase iniziale del monitoraggio sono state campionate stazioni all'esterno della nave (tab.1) e all'interno della nave (tab.2). Come si osserva nessuna delle stazioni poste all'esterno della nave ha evidenziato tossicità acuta con V. fischeri. Per quanto riguarda, invece, quelle poste all'interno della nave, si evidenzia tossicità acuta per due di queste. Infatti, la stazione P11\_D ha evidenziato una EC50 =83.60% e la stazione P11\_E una EC50 =57.27%.

Successivamente al mese di gennaio, il monitoraggio è proseguito sulle stazioni riportate in fig.1 con cadenza almeno bisettimanale fino al mese di ottobre. Tutte le stazioni monitorate hanno dato esito negativo in tutti i campionamenti effettuati.

Tab.1 Stazioni monitorate all'esterno della nave durante la fase iniziale (livello 1) di monitoraggio

TOSSICITA' ACUTA CON BATTERI BIOLUMINESCENTI						
Assenza/Presenza di tossicità						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
20/01/2012						AT
24/01/2012	AT	AT	AT	AT	AT	AT
25/01/2012		AT	AT	AT		AT
26/01/2012		AT	AT	AT		AT
27/01/2012		AT	AT	AT		AT
29/01/2012	AT			AT		

Tab. 2 Stazioni monitorate all'interno della nave durante la fase iniziale (livello 1) di monitoraggio

TOSSICITA' ACUTA CON BATTERI BIOLUMINESCENTI					
Assenza/Presenza di tossicità					
	P11_A1	P11_A2	P11_A3	P11_D	P11_E
23/01/2012	AT	AT	AT	EC <sub>50</sub> = 83.60%	EC <sub>50</sub> = 57.27%
TOLUENE					
23/01/2012	<0.2	<0.2	<0.2	0.37	0.46

Prelievo P11\_D: parte emersa uscita corridoio (collocazione incerta), prelievo P11\_E parte emersa uscita corridoio (collocazione incerta).

#### *Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyta)*

I prelievi sono incominciati alla fine del mese di gennaio dapprima con cadenza bisettimanale e successivamente, dal mese di aprile, con cadenza settimanale. I risultati dei saggi eco tossicologici svolti da ISPRA non hanno evidenziato criticità fino alla metà del mese di maggio e ciò è consistente con le analisi chimiche riportate da ARPAT. I campionamenti effettuati il 24 e il 27/2/2012 hanno evidenziato un'elevata biostimolazione della crescita algale nelle tre stazioni P2, P4, P6. La settimana successiva (2/3/2012) si registra, viceversa, una elevata inibizione della crescita algale che risulta essere concomitante a ritrovamento di discrete quantità di tensioattivi anionici. Successivamente, si registrano elevatissime biostimolazioni della crescita algale (campioni del 5 e 7/3/2012) quando anche i dati chimici rilevano ancora la presenza di tensioattivi anionici, solventi aromatici in tracce e una concentrazione dell'N totale 4 volte superiore a quella di largo. Dal 9 marzo i risultati dei saggi rientrano nella normalità e, dal 28 marzo anche i parametri chimici rientrano nella norma.

Tab. 3 Risultati del test di tossicità con *Phaeodactylum tricornutum*

	Stazioni		
Date di prelievo	P2	P4	P6
27/01/2012	<i>Non campionato</i>		
31/01/2012	0 < I < 20%	0 < I < 20%	0 < I < 20%
06/02/2012	0 < I < 20%	0 < I < 20%	0 < I < 20%
09/02/2012	0 < I < 20%	0 < I < 20%	0 < I < 20%
15/02/2012	0 < I < 20%	0 < I < 20%	0 < I < 20%
16/02/2012	0 < I < 20%	0 < I < 20%	0 < I < 20%
17/02/2012	0 < I < 20%	0 < I < 20%	20 < B < 40%
24/02/2012	BB>40%	BB>40%	BB>40%
27/02/2012	20 < B < 40%	BB>40%	BB>40%
29/02/2012	20 < I < 40%	BB>40%	<i>NP</i>
02/03/2012	I>40%	BB>40%	BB>40%
05/03/2012	0 < I < 20%	BB>40%	BB>40%
07/03/2012	BB>40%	BB>40%	BB>40%
09/03/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
14/03/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
21/03/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
28/03/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
03/04/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
10/04/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
16/04/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
24/04/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
02/05/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
09/05/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
15/05/2012	20 < B < 40%	20 < B < 40%	20 < B < 40%
<b>Giudizio di tossicità</b>			
	<i>Tox Assente</i>	I = Inibizione % crescita	
	<i>Tox Media</i>	B = Biostimolazione % crescita	
	<i>Tox Alta</i>	BB = Biostimolazione % crescita > 40%	
	<i>Tox Molto Alta</i>		

*Paracentrotus lividus*

I saggi di spermio tossicità e di inibizione dello sviluppo larvale del riccio di mare sono stati effettuati dalla fine del mese di gennaio con cadenza bisettimanale fino al mese di aprile. I risultati sono riportati nella tabella che segue.



Tab. 4 Risultati del test di tossicità con *Paracentrotus lividus*

Date di prelievo	Stazione P2		Stazione P4		Stazione P6	
	Fecondazione	Sviluppo	Fecondazione	Sviluppo	Fecondazione	Sviluppo
27/01/2012	Non campionato		Non campionato		EC20>90	EC20>90
31/01/2012	EC20>90	E C20>90	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20<90; EC50>100
06/02/2012	EC20<90; EC50>100	EC20<90; EC50>100	EC20>90	40<EC50<100	EC20>90	EC20<90; EC50>100
09/02/2012	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20>90
15/02/2012	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20<90; EC50>100	EC20>90	EC20>90
16/02/2012	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20<90; EC50>100
17/02/2012	EC20>90	EC20<90; EC50>100	EC20>90	EC20>90	EC20>90	EC20<90; EC50>100
24/02/2012	EC20>90	EC20<90; EC50>100	EC20<90; EC50>100	EC20<90; EC50>100	EC20>90	EC20>90
27/02/2012	EC20>90	EC20<90; EC50>100	EC20>90	EC20<90; EC50>100	EC20>90	EC20<90; EC50>100
29/02/2012	EC20<90; EC50>100	EC20<90; EC50>100	EC20>90	40<EC50<100	Non campionato	
14/03/2012*	Non eseguito	EC20>90	Non eseguito	EC20>90	Non eseguito	EC20>90
21/03/2012*	Non eseguito	EC20>90	Non eseguito	EC20>90	Non eseguito	EC20>90
28/03/2012*	Non eseguito	EC50<40	Non eseguito	EC20>90	Non eseguito	EC20>90
<b>Giudizio di tossicità</b>						
	<i>Tox Assente</i>					
	<i>Tox Media</i>					
	<i>Tox Alta</i>					
	<i>Tox Molto Alta</i>					

Per quanto riguarda il saggio di embriotossicità è possibile registrare, in riferimento alle stazioni P2, P4, un generale scadimento della qualità delle acque nel corso del tempo. Per quanto riguarda il saggio di spermio tossicità tutti i campioni analizzati, ad eccezione del campione P2 prelevato il 06/02/2012 ed il 29/02/2012 e del campione P4 del 24/02/2012, risultano privi di tossicità.

### **Discussione e conclusioni**

L'applicazione di saggi eco-tossicologici per la valutazione della tossicità delle acque nell'area interessata dal naufragio della nave Concordia, ha fornito le seguenti informazioni: il test con *V. fischeri* è risultato il meno sensibile, infatti nessun campione è risultato tossico durante tutto il periodo di campionamento per tutte le stazioni esterne alla nave. Soltanto due campioni prelevati all'interno della nave sono risultati tossici. Il test con *Phaeodactylum tricornutum* ha evidenziato soprattutto fenomeni di biostimolazione (>40%) nel periodo 24.02-07.03 sia nella stazione in

prossimità della nave sia in quella in prossimità del dissalatore. Soltanto la stazione P2 ha evidenziato fenomeni di inibizione della crescita dal 29.02 al 05.03 in concomitanza con alterazioni dei dati chimici. Il saggio di embriotossicità con *Paracentrotus lividus* è risultato molto sensibile evidenziando fenomeni di tossicità alta e molto alta soltanto nelle stazioni in prossimità della nave anche quando gli altri test sono risultati negativi.

### ***Bibliografia***

APAT IRSA CNR (2003) - Manuale 29/03; metodo 8030.

UNI EN ISO 10253 (2006) - Qualità dell'acqua - Saggio di inibizione della crescita di alghe marine con *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornerum*.

## TAVOLA ROTONDA 2: BANDI E OPPORTUNITÀ NAZIONALI/INTERNAZIONALI IN AMBITO ECOTOSSICOLOGICO

*di Marco Faimali e Cristian Mugnai*

---

La tavola rotonda ha sottolineato l'importanza di una nuova figura professionale che, anche se stenta ad essere riconosciuta e sostenuta, in questi ultimi anni ha assunto una importanza strategica fondamentale: il manager della ricerca.

Nell'ambito della nostra comunità potremmo tentare di valorizzare queste figure interne ad ogni ente e tentare di "fare squadra" mettendole in contatto in una specie di "GdL virtuale" sulla progettualità ed in rete a disposizione di tutti per sfruttare le diverse opportunità regionali, nazionali ed internazionali che i diversi bandi possono offrire per le eterogenee tematiche di nostro interesse.

# OPPORTUNITÀ DI FINANZIAMENTO PER LA RICERCA E L'INNOVAZIONE IN AMBITO ECOTOSSICOLOGICO

*di G. Ciurlia<sup>a</sup>; A. Toncini<sup>b</sup>*

<sup>a</sup>Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Lesina, Italy –  
giuseppina.ciurlia@fg.ismar.cnr.it

<sup>b</sup>Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Genova, Italy –  
annamaria.toncini@ismar.cnr.it

---

**Abstract** -. In un'economia globale aperta, la competitività si basa sulla capacità delle aziende di creare beni e servizi ad elevato valore aggiunto. Al centro della strategia Europa 2020 c'è la convinzione che occorrono R&S e innovazione per creare una crescita intelligente e sostenibile, per fare uscire l'Europa dall'attuale crisi economica. L'intervento che segue vuole offrire una panoramica generale sulle opportunità di finanziamento in ambito ecotossicologico per Enti e Imprese che intendono investire in attività di Ricerca e innovazione, illustrando i meccanismi di finanziamento e le possibilità di partenariato, a livello regionale, nazionale ed europeo. Sulla tematica "ecotossicologia" si fornirà un quadro dei bandi in corso o in uscita nel 2013 e un'anticipazione del prossimo programma europeo per la ricerca, Horizon 2020.

Parole chiave: ricerca, finanziamenti, partnership

## *Trovare le fonti di finanziamento:*

Come trovare le informazioni sulle fonti di finanziamento più appropriate per una determinata attività.

Base di sviluppo delle proprie idee. Occorre riflettere bene sulle proprie idee e delineare in modo chiaro la propria proposta. È meglio lasciarsi guidare dalle proprie idee anziché dalle fonti di finanziamento disponibili sul momento.

## *Principali Strumenti e opzioni di finanziamento*

Europei:

- 7° Programma quadro per la ricerca
- Il Programma quadro per la competitività e l'innovazione (CIP)
- I Fondi strutturali – La politica di coesione
- La politica agricola comune – la politica di sviluppo rurale dell'UE
- La politica della pesca dell'UE
- Ambiente - LIFE+
- Lo strumento di assistenza preadesione (IPA)
- Programmi di cooperazione transfrontaliera ENPI ...

Nazionali:

- Contributi Ministeriali, Regionali (POR), Fondazioni, Diffusione Cultura Scientifica, Prin, Far, Fibr, ecc.

### *Horizon 2020:....cosa avremo nei prossimi anni.*

L'evoluzione verso una crescita sostenibile basata sull'innovazione è al centro della risposta dell'UE alla globalizzazione. A giugno 2010 i capi di Stato e di governo dell'UE hanno approvato la strategia Europa 2020, volta a riportare l'economia europea in carreggiata.

A raccogliere la sfida per uscire dalla crisi e garantire all'Europa competitività globale, crescita e lavoro, è stato varato Horizon 2020, il nuovo strumento europeo che, dal 2014 al 2020, finanzierà la ricerca e l'innovazione con un budget di 80 miliardi di euro.

Horizon 2020 cercherà di colmare il gap tra ricerca e mercato, aiutando le imprese innovative a sviluppare la loro tecnologia e rendendo più forti i partenariati tra organismi di ricerca e privati.

Le risorse verranno indirizzate verso tre priorità fondamentali:

- **scienza di eccellenza** (elevazione del livello di eccellenza della base scientifica e delle strutture di ricerca)
- **leadership industriale** (grandi investimenti in tecnologie industriali essenziali, accesso facilitato ai finanziamenti con capitali di rischio, aiuto alle PMI innovative)
- **miglioramento sociale** (sanità, sicurezza alimentare, energia pulita, trasporti intelligenti, clima, società)

Nel prossimo programma avremo accesso semplificato ai finanziamenti, norme più semplici, misure specifiche per le PMI, forte interazione pubblico-privato, cooperazione internazionale.

### *Approfondimento:*

Eventuali Bandi in corso.

Panoramica delle opportunità di finanziamento fino al 2013.

## SESSIONE D: RUOLO DELL'ECOTOSSICOLOGIA NELL'ECOSOSTENIBILITÀ DEI PROCESSI PRODUTTIVI E NELLA DEFINIZIONE DELLA PERICOLOSITÀ DEI MATERIALI (PARAMETRO H14)

*di Marco Francese, Raffaella Cardente e Marta Ultrè*

---

La sessione, incentrata quasi esclusivamente solo sull'H14, è stata caratterizzata da una notevole chiarezza da parte dei relatori che hanno fornito una visione schematica e comprensibile dello stato di fatto sia normativo che tecnico. In particolare, nella comunicazione su invito, il Prof. Persoone fornisce un quadro di insieme sull'evoluzione del nuovo codice di classificazione dei rifiuti pericolosi ed ha mostrato il panorama europeo in materia. La dott. ssa Balzamo descrive il panorama in ambito nazionale e la dott. ssa Conti entra negli aspetti tecnici della preparazione dei campioni e dei saggi biologici da eseguire. I casi studio affrontati sono pertinenti e ben si collegano al tema "H14"; in particolare quello del dott. Langellotti descrive un approccio metodologico in ecotossicologia su un rifiuto da digestato da valutare per il suo possibile riutilizzo. Il campione considerato, pur non rientrando nella categoria dei rifiuti pericolosi, evidenzia comunque l'esigenza di adottare pratiche di valutazione similari. Le applicazioni dell'ecotossicologia a materiali di dragaggio esposte dal dott. Onorati, sono uno spunto per affrontare l'altro aspetto della mattinata, ovvero la definizione della pericolosità dei materiali. La presentazione mette in evidenza le informazioni ottenibili con l'utilizzo di indici integrati applicati ad una batteria di test. Il tema dei materiali viene ripreso nei poster presentati nella sessione prendendo in considerazione sia studi su campioni presunti ecologici sia su composti molto tossici (pesticidi ed arsenico). L'ultimo poster (Dott. Leoni, ARPAM) chiude la sessione illustrando uno studio comparativo su di un rifiuto pericoloso applicando la logica delle batterie (v. sessione C). L'approccio metodologico considera organismi ed end point aggiuntivi rispetto a quelli indicati dall'ADR.

Come riflessione generale, sembra che a livello europeo non si delinea una prospettiva di revisione normativa né di confronto con le esperienze di test di interconfronto, in virtù del fatto che viene data piena libertà operativa ai vari stati membri fino al 2015. Dalla visione della norma e dalle sue successive revisioni, appare sempre più evidente come il codice H14 stia diventando uno spartiacque, un elemento deliberatorio in presenza di rifiuti che sono identificati come pericolosi ma non classificati come tali in assenza di altri codici positivi; si ricorda infatti che in caso di conferma di altri codici di pericolosità non si procede ad analisi con saggi biologici per la valutazione dell'H14. Pertanto, in questo caso, il codice H14 diventerebbe l'unico elemento utile nel processo decisionale per optare per le ipotesi di riutilizzo di rifiuti primari e secondari (es residui di depurazione, percolati, residui di compost da amalgame, non solo di rifiuto umido). E' risultato evidente che l'adozione della procedura di cui all'ADR [Accordo sul trasporto di merci pericolose] in toto come riferimento per la caratteristica H14 rende poco chiara e sicuramente non aderente alle caratteristiche dei campioni la preparazione del campione stesso, di cui nell'ADR non vi è traccia; non va ignorato, inoltre, che i limiti di accettabilità prima definiti dal parere ISPRA/ISS vengono soppiantati da quelli molto meno restrittivi previsti dall'ADR. ISPRA ha inoltre comunicato che l'ADR, protocollo temporaneamente adottato,

potrebbe essere sostituito dal regolamento CLP (Regolamento (CE) n. 1272/2008) nel 2015. In questo caso gli organismi rimarrebbero gli stessi dell'ADR ma varierebbero i valori limite per l'attribuzione della caratteristica H14 rispetto all'LC50 ed agli EC50, portandoli da un intervallo tra 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> a quello tra 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>.

In definitiva, ISPRA si è impegnato a redigere le proprie linee guida sugli aspetti tecnico – analitici per il protocollo ADR., e allo stesso tempo è emersa l'esigenza da parte dei partecipanti al convegno di introdurre nella norma e negli allegati tecnici protocolli molto più coerenti con le linee guida elaborate dal GdL ISPRA fino ad ora.

# TOXICITY TESTING FOR HAZARDOUS WASTE CLASSIFICATION (H14 CRITERION): PRACTICAL EXPERIENCES

*by G. Persoone*

Laboratory for Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Ghent University, Ghent, Belgium - guido.persoone@UGent.be  
MicroBioTests Inc. Mariakerke (Ghent), Belgium – Microbiotests@skynet.be

---

**Abstract** - The presentation will report on the origin and the approach for toxicity testing in the framework of the European legislation on the classification of wastes, as imposed by the H14 criterion for assessment of the ecotoxic hazard of wastes. The organization by the UBA, and the supervision of an International ring test with a selected test battery will be presented and the results and the conclusions of this extensive ring test will be highlighted. Information will also be given on the application of Toxkit microbiotests in this ring test. The UBA document "Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes" which was worked out subsequent to the International ring test will be discussed. Finally, the H14 protocol for classification of sediments in hazardous or non hazardous wastes, which has recently been worked out in France and is now under evaluation, will be presented.

Keywords: waste hazard criterion H14 ; test battery; microbiotests

The classification of wastes into "hazardous" and "non hazardous" is based on the system for the classification and labelling of dangerous substances and preparations, of which the properties which render waste hazardous are laid down in Annex III of the Waste Framework Directive 2008/98/EC.

A European Waste List (EWL) has been worked out in which some wastes are marked as "hazardous" and others classified in so-called "mirror entries" (= possibly hazardous). To differentiate between hazardous and non hazardous wastes in mirror entries, the EWL specifies 14 "hazard criteria" (labeled from H1 to H14).

Hazard criterion H14 specifically deals with "ecotoxic", i.e. substances and preparations which present or may present immediate or delayed risks for one or more sectors of the environment. H14 hence describes the ecotoxicological potential or environmental hazards as an intrinsic property of waste.

It is interesting to note in this regard that the hazardous property H14 Ecotoxic is evaluated by different means in EU member states, and that as of to date no unified approach has been adopted in EU legislation.

Only one Technical Report has been issued so far (in 2010) by the European Committee for Standardization (CEN/TR 16110) as a guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste.

Historically this document is inspired by an International Workshop, organized in Italy in 2005 jointly by the German Federal Agency for the Environment (UBA), and the Joint Research Centre (ISPRA) on the ecotoxicological characterization of waste and the H14 criterion. During this Workshop a distinct need for a harmonized test set was identified, which should comprise test organisms representative for various



ecosystems and trophic levels. This harmonized test battery should be developed and validated in the framework of the European Normalization Committee CEN TC 292 which works on the scientific standardization of methods for an assessment of solid waste and waste eluates.

The validation of test procedures is an essential part in the standardization process of each ecotoxicological test, and the CEN always demands an internationally conducted ring test on typical test substrates, to provide valid information on the practicability and the reproducibility of the results for the applied test procedures.

The UBA therefore took the initiative in 2008 - in a collaborative project with several other organisations in Germany - to organize an international ring test for validation of a set of selected bioassays and their test procedures.

Laboratories from all the EU countries were invited to participate and eventually 60 laboratories from 15 countries (including one laboratory from the USA) participated in this ring test. Three representative waste types were selected for the ring test: ash from an incineration plant contaminated mainly with heavy metals (INC), soil containing high concentrations of organic contaminants (SOI) and preserved wood waste contaminated with copper and other heavy metals (WOO).

The waste samples were prepared and distributed to the participants by the German Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM).

The selection of the bioassays for the ring test originates from the European Standard EN 14735 (2005) which describes sample preparation and provides an informative collection of appropriate test procedures. Eventually 5 bioassays were selected for the ring test: 3 aquatic tests to be applied on the waste leachates (micro-algal test with *Pseudokirchneriella subcapitata* or *Desmodesmus subspicatus*, acute *Daphnia magna* test and bacterial luminescence inhibition test with *Vibrio fischeri*) and 2 terrestrial "direct contact tests": the earthworm acute test with *Eisenia fetida* or *Eisenia andrei* and plant tests with oat (*Avena sativa*) and turnip (*Brassica rapa*).

The participants were also invited to perform assays with other test species, and eventually data for 10 other tests have been submitted.

Almost all the tests were performed according to ISO Standards.

All by all, 634 data sets were produced from the basic test battery, 196 data sets from the additional assays, and 218 data sets were also submitted for the respective reference substances.

Data evaluation was done following recommendations of ISO (2002) and Environment Canada (2005) and showed that only a few data sets could not be taken into consideration (because of lack of reference data or because they were statistical or biological outliers).

All the results of the bioassays of the basic set and the additional test methods are described and discussed in the 29 Chapter book: Ecotoxicological Characterization of Waste (H.Moser and J.Römbke, 2009). It may be mentioned that several laboratories have used Toxkit microbiotests (such as the Daphtoxkit, Algaltoxkit, Rotoxkit and Ostracodtoxkit) for toxicity testing of the wastes. One chapter in the book deals specifically with the results and the precision of the Toxkit tests, and another chapter addresses the comparison between the results of the Toxkit microbiotests and the standard tests.

One of the major conclusions of the extensive ring test is that the results confirm that a combination of a battery of biological tests and chemical residue analysis is needed for a meaningful ecotoxicological characterization of wastes. Another conclusion is that the results of the Daphtoxkit and the Algaltoxkit microbiotests *versus* those of the standard tests showed that there was no difference in sensitivity for the waste materials.

Last but not least, it was indicated that with small modifications, the basic test battery is considered to be well suitable for the hazard and risk assessment of wastes and waste eluates.

Subsequent to the ring test, the UBA has worked out in 2008 a document on "Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes". The document specifies the test strategy that shall be followed in an "extended limit test". The approach comprises two short-term assays (algae and *Daphnia*) and a test for determination of the genotoxicity (Umu test), to be applied on the waste eluates. Three tests must also be applied on the solid waste: a plant growth test (with *Brassica rapa*), an earthworm avoidance test (with *Eisenia fetida* or *Eisenia andreii*), and a bacterial contact test (with *Arthrobacter globiformis*). A more extended test procedure (with additional tests) is also described and should be applied in case the waste is classified as hazardous according to H14 on the basis of solid contents, but the waste holder still wishes to demonstrate the absence of ecotoxicological risks (e.g. for wastes containing heavy metals in elementary form). The Recommendations document finally also contains a chapter on the ecotoxicological characterization for assessing the risks of waste management scenarios.

In France, the Ministry for Ecology, Energy, Sustainable Development and the Sea (MEEDDM), has expressed the wish that "sediments" should basically be considered "as wastes" and should therefore be analysed on the basis of the H14 criterion, to classify them as hazardous or non-hazardous sediments.

A protocol has therefore been worked out in France in 2009 by the working group "Hazardous versus non-hazardous sediments" for the H14 parameter applied to marine and freshwater sediments, for ratification by the MEEDDM. This protocol, which is now under investigation by application to a variety of sediments, involves toxicity testing of the eluate (acute and chronic toxicity) and of the crude matrix (acute toxicity).

The test protocol specifies that the raw sediment has first to be centrifuged and the pore water tested on *Vibrio fischeri* (bacterial luminescence inhibition test). The solid sediment fraction is subsequently leached out and filtered, for application of two acute toxicity tests with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* respectively. Depending on the obtained CE50 value, the sediment is either classified as "hazardous" (if the value is > 10 TU), or a chronic toxicity test with the rotifer *Brachionus calyciflorus* has to be made. If the CE20 of the latter test is >100 TU, the sediment is considered as hazardous. If this value is below 100 TU, an acute toxicity test on germination and growth of 2 higher plants (*Brassica napus* and *Avena sativa*) shall be performed. If the CE50 for the 2 plants is below 10 TU, the sediment is classified as non hazardous. In turn, if the CE50 of one of the plants is higher than 10 TU, the sediment belongs to the category of hazardous wastes.

# I RIFIUTI E LA PERICOLOSITÀ PER L'AMBIENTE (H14): EVOLUZIONE NORMATIVA E QUADRO DI RIFERIMENTO.

*di A. Paina, D. Conti, S. Balzamo \*, A. Pati, C. Martone.*

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale – Servizio di Metrologia Ambientale – Via di Castel Romano 100 – 00128 Roma  
andrea.paina@isprambiente.it;daniela.conti@isprambiente.it;  
stefania.balzamo@isprambiente.it;alessandra.pati@isprambiente.it;  
cristina.martone@isprambiente.it.

---

**Abstract** - Il recepimento della direttiva 2008/98/CE, tramite il DLgs 205/2010, ha introdotto alcune modifiche al complesso quadro normativo di riferimento in materia di rifiuti delineato dal DLgs 152/2006. In particolare tra le novità più rilevanti, vi è la definizione della pericolosità dei rifiuti per l'ambiente, ovvero, la determinazione della caratteristica di pericolo H14 (*ecotossico*). Con l'emanazione della direttiva citata, la determinazione della caratteristica di pericolo H14 deve essere effettuata secondo i criteri stabiliti dalla normativa sulla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose, la direttiva 67/548/CEE, ovvero, in ultima analisi, secondo quanto previsto dal regolamento CLP (Regolamento CE/1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele) che dal 2015 abroga e sostituisce tale direttiva insieme a quella sulla classificazione dei preparati pericolosi (direttiva 99/45/CE). Con la conversione in legge del DL 2/2012 sono state introdotte, nel quadro normativo nazionale, ulteriori novità, ed in particolare, il fatto che la caratteristica di pericolo H14 debba essere attribuita ai rifiuti, secondo le modalità dell'accordo ADR (Accordo internazionale per il trasporto di merci pericolose su strada) per la classe 9, categorie M6 ed M7, in attesa che a livello europeo, con la revisione della decisione 2000/532/CE, vengano emanate precise indicazioni in merito.

Parole chiave: ecotossicità, H14, rifiuti.

## ***Introduzione***

Il recepimento della direttiva 2008/98/CE e le successive modifiche apportate dalla conversione in legge del DL 2/2012 hanno determinato alcune importanti conseguenze in merito alla definizione della pericolosità per l'ambiente dei rifiuti. In particolare, nella direttiva citata viene esplicitamente indicato che per l'attribuzione di tale caratteristica di pericolo "ecotossico" (H14) si deve far riferimento ai criteri stabiliti nell'allegato VI della direttiva 67/548/CEE relativa alla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose, mentre, qualora pertinente, si applicano i valori limite di cui agli allegati II e III della direttiva 1999/45/CE relativa alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. Tali direttive tuttavia, sono state abrogate e sostituite dal regolamento CE/1272/2008 (regolamento CLP) a decorrere dal 1° giugno 2015; nel periodo transitorio potranno essere utilizzati anche i criteri stabiliti dal regolamento. In ambito nazionale l'attuale metodologia di riferimento, secondo le modifiche introdotte con il DL 2/2012, è quella prevista dall'accordo ADR per le classe 9, categoria M6, "Materie pericolose

per l'ambiente acquatico, liquide" ed M7 "Materie pericolose per l'ambiente acquatico, solide". In tale Accordo, relativo al trasporto delle merci pericolose, così come nel regolamento CLP, relativo alla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze e delle miscele, le metodologie sono analoghe. I saggi ecotossicologici da applicare per la determinazione della caratteristica di pericolo H14, sono quelli previsti dall'allegato C al regolamento CE/440/2008 (metodi previsti in ambito REACH): C1 (saggio di tossicità acuta per i pesci), C2 (saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia sp*) e C3 (saggio di inibizione della crescita con alghe di acqua dolce e cianobatteri). Al di là del riferimento normativo applicabile, sia esso quanto previsto dall'ADR o dal CLP, il problema principale risiede nella difficoltà ad applicare ai rifiuti, un sistema pensato e sviluppato per sostanze e miscele ed è quindi necessario valutare alcune questioni applicative rilevanti. Nel presente lavoro, viene analizzato il quadro normativo relativo alla determinazione della ecotossicità di un rifiuto, valutandone, per quanto riguarda i saggi biologici, gli aspetti applicativi più complessi e critici.

### ***Evoluzione del quadro tecnico-normativo in materia di pericolosità dei rifiuti per l'ambiente.***

La pericolosità per l'ambiente dei rifiuti era stata introdotta nella normativa comunitaria con la direttiva 91/689/CE relativa ai rifiuti pericolosi; successivamente, in applicazione a tale direttiva, veniva emanata la decisione 94/904/CE che istituiva l'elenco dei rifiuti pericolosi. In seguito, con la decisione 2000/532/CE viene istituito un nuovo elenco che comprende tutti i rifiuti, pericolosi e non, ed introduce le voci specchio (mirror entry) per alcune tipologie specifiche. I rifiuti caratterizzati da voci specchio sono quelli che possono o meno contenere sostanze pericolose che, al superamento determinati valori limite, conferiscono al rifiuto una o più caratteristiche di pericolo (vedi l'Allegato I alla parte IV del DLgs 152/2006). In questo caso quindi, la pericolosità del rifiuto deve essere verificata a differenza degli altri rifiuti del catalogo la cui caratteristica è definita a priori ed è vincolante (vedi l'Allegato D alla parte IV del DLgs 152/2006). Per quanto riguarda la caratteristica di pericolo "ecotossico" (H14) tuttavia, non vengono in alcun modo specificate le modalità di determinazione lasciando agli Stati Membri l'onere dello studio e dell'applicazione di metodi adeguati. In un lavoro pubblicato nel 2008 da Ökopol e ARGUS, emerge che ben 14 Paesi Europei, pur in mancanza di precise indicazioni normative, già adottano criteri specifici per la definizione dell'ecotossicità dei rifiuti. L'Italia risultava essere l'unico paese che escludeva la possibilità di caratterizzare dal punto di vista ecotossicologico il rifiuto, giustificando la propria scelta con il fatto che non vi erano, né a livello europeo né nazionale, indicazioni in merito ai metodi ed ai criteri da adottare per la valutazione di tale caratteristica, (punto 5, Allegato D al DLgs. 152/2006 vigente anteriormente alle modifiche apportate dal DL 2/2012). In alcuni Stati Membri, inoltre, sono applicati saggi biologici per la determinazione della caratteristica di pericolo H14 come mostrato nella Tabella 1.

La necessità di definire un criterio univoco e condiviso a livello europeo per la definizione della ecotossicità di un rifiuto, ha portato l'Ente Europeo di normalizzazione (CEN), ad istituire nel 1999, nell'ambito delle attività della Commissione Tecnica 292 "Characterization of waste", un gruppo di lavoro (WG - Working Group) specifico, il WG7. Il WG7 (*Characterization of waste - Ecotoxicological properties*), aveva lo scopo di valutare la possibilità di utilizzare saggi biologici, per la determinazione delle proprietà ecotossicologiche dei rifiuti (solidi ed estratti acquosi). Il lavoro svolto dal WG7 ha portato alla pubblicazione, nel settembre 2005, della norma EN14735, *Characterization of waste - Preparation of waste samples for ecotoxicity tests*, in cui vengono definite le condizioni di trasporto, conservazione e preparazione dei campioni

di rifiuto, la preparazione dei campioni di prova e del lisciviato di un rifiuto, insieme ad una lista descrittiva dei saggi ecotossicologici applicabili. La necessità di identificare un gruppo di saggi armonizzati per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti, ha portato l'Agenzia Federale per l'Ambiente tedesca (UBA) e l'Istituto per l'Ambiente e la Sostenibilità dell'EU-JRC (Joint Research Centre), tramite il WG7 del CEN/TC292, ad organizzare un circuito di interconfronto cui hanno partecipato 37 laboratori di 15 Paesi diversi (ISPRA 2008, Moser 2009). Il CEN/TC WG7, a valle dell'Interconfronto Internazionale e sulla base dei risultati ottenuti, ha dato inizio al processo di convalida della norma EN14735. Il lavoro svolto, ha condotto alla pubblicazione del Rapporto Tecnico CEN/TR16110 (Characterization of waste—Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste) nel settembre 2010. A seguito delle modifiche introdotte dalla direttiva quadro sui rifiuti, ISPRA ed ISS, avevano proposto, tramite un parere inviato al Ministero dell'Ambiente, una procedura per la determinazione della caratteristica di pericolo H14 che seguiva l'impostazione della norma EN14735 con la previsione, nel caso di rifiuti a composizione non nota, di effettuare una batteria di saggi biologici costituita da *Vibrio fischeri* (EN ISO 11348), *Daphnia magna* (EN ISO 6341) e alghe unicellulari (EN ISO 8692). Tuttavia, le modifiche apportate a livello normativo con la previsione di adottare la metodologia prevista dall'ADR, hanno reso tale parere non più applicabile.

*Tabella 1 – Tipologie di saggi biologici applicati in alcuni paesi europei per la determinazione della caratteristica di pericolo H14 (da Ökopol & ARGUS, 2008)*

Tipo di saggio	Stato Membro
<b>Saggi su lisciviato con organismi acquatici</b>	
Saggio acuto con pesci	Bulgaria
Saggio acuto con <i>Daphnia</i>	Finlandia, Spagna, Germania, Francia e Regno Unito
Saggio cronico con alga (inibizione della crescita)	Finlandia, Ungheria, Germania, Francia e Regno Unito
Saggio acuto con batteri bioluminescenti ( <i>Vibrio fischeri</i> )	Finlandia, Spagna, Francia
Saggio cronico con <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Francia
Saggio cronico con <i>Brachionus calyciflorus</i>	Francia
Saggio di genotossicità con <i>Salmonella typhimurium</i>	Germania
<b>Saggi su matrice solida (rifiuto tal quale) con organismi terrestri</b>	
Saggio acuto con Anellidi	Germania, Francia
Saggio con Piante superiori terrestri	Germania, Francia, Bulgaria, Ungheria, Finlandia

### ***Riferimenti normativi in vigore.***

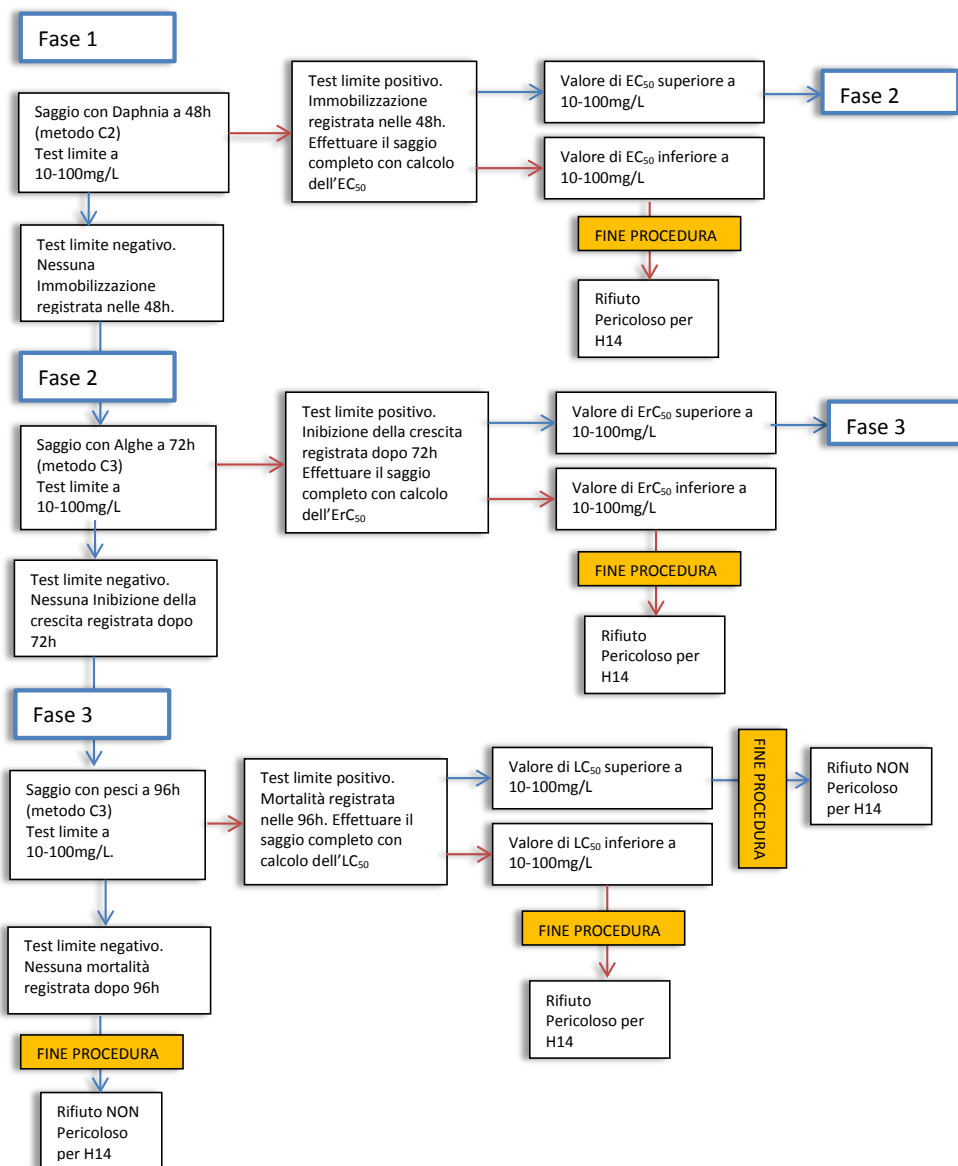
A livello legislativo la Commissione Europea ha in corso un processo di armonizzazione delle normative che riguardano i criteri per la classificazione delle sostanze e delle miscele e le norme relative all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele pericolose. L'intenzione è di armonizzare la terminologia e le definizioni utilizzate nel regolamento CLP che dovrebbero essere coerenti con quelle del regolamento REACH (regolamento CE/1907/2006), con le norme in materia di trasporto (ADR) e con le definizioni del GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals). Questo processo riguarda anche la classificazione dei rifiuti perché, se da una parte il regolamento CLP espressamente

dichiara che i rifiuti non costituiscono una sostanza, una miscela o un articolo (art. 2, prg. 3) e quindi non sarebbero nel campo di applicazione di tale norma, dall'altra, le indicazioni della direttiva quadro sui rifiuti (direttiva 2008/98/CE) e le proposte di modifica della decisione 2000/532/CE, sono indirizzate verso l'applicazione del regolamento CLP anche per la classificazione dei rifiuti. L'attuale proposta tecnica di modifica dell'art. 2 della decisione 2000/532/CE, prevede l'applicazione dei metodi biologici, C1, C2 e C3 del regolamento CE/440/2008 (che è il regolamento di attuazione del REACH), nel caso in cui per un rifiuto non sia possibile determinare la tossicità "indirettamente" sulla base delle sostanze componenti. Tuttavia oltre ai metodi C1, C2 e C3 sarebbe consentita l'applicazione sia di altri metodi riconosciuti a livello internazionale, che di linee guida che permettano di determinare adeguatamente la pericolosità dei rifiuti. Al momento, la questione relativa alla pericolosità dei rifiuti per l'ambiente terrestre, a differenza di quanto accadeva nelle direttive precedenti (direttiva 67/548/CEE e direttiva 99/45/CE) non viene considerata né dal regolamento CLP né dall'ADR. Dal punto di vista dei test ecotossicologici, devono essere applicati i metodi C1, C2 e C3 dell'allegato C al regolamento CE/440/2006, metodi sviluppati in ambito OECD.

Perché il rifiuto sia considerato pericoloso per H14 è sufficiente che anche uno solo dei test sia positivo, ma per non essere pericoloso, il rifiuto deve dare esito negativo per tutti e tre i saggi. I saggi devono essere effettuati in tutti i casi in cui la composizione del rifiuto non è nota e solo per i rifiuti per cui esiste una voce specchio (mirror entry). Infatti, solo per questi rifiuti la pericolosità va accertata ovvero, si deve verificare se determinate sostanze, considerate pericolose, sono presenti ed in quale concentrazione. I limiti entro i quali un rifiuto è considerato pericoloso per l'ambiente acquatico, sono 10 mg/L per l'ADR e 100 mg/L secondo il regolamento CLP. Infine, per la classificazione del rifiuto non è richiesta l'individuazione del livelli di pericolo ("acuto1", "cronico 1", "cronico 2" o "cronico 3") ma solo di conoscere se un rifiuto è classificabile o meno come pericoloso per l'ambiente. I protocolli per i saggi biologici stabiliti dal regolamento REACH, in analogia con i relativi metodi OECD, prevedono la possibilità di effettuare un test limite a 100 mg/L per verificare se l' $LC_{50}/EC_{50}/ErC_{50}$  è superiore a tale limite. A questo proposito va ricordato che nell'ADR, il valore limite di pericolosità per l'ambiente acquatico è 10 mg/L, quindi si tratterà di chiarire se, nel caso specifico, si debba fare un test limite a tale concentrazione anziché a 100 mg/L. Nel caso in cui sia necessario applicare i saggi biologici, si potrà effettuare prima un test limite e questo rappresenta certamente una semplificazione che consentirà di rendere meno oneroso, tecnicamente ed economicamente il procedimento da svolgere. Uno schema semplificato della procedura da effettuare può essere quello descritto nella figura 1.

Per concludere, si dovrà affrontare la questione forse più complessa da risolvere, ovvero il fatto che si devono testare quantitativi di rifiuti molto *piccoli*, dell'ordine di 10-100 mg/L e quindi si pone il problema della rappresentatività del campione di rifiuto. A questo proposito il laboratorio del Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA sta effettuando alcune prove per definire un protocollo che possa consentire di ottenere un campione rappresentativo di rifiuto in relazione all'utilizzo di quantitativi così ridotti. Per un approfondimento degli aspetti tecnici brevemente descritti nel presente documento, si rimanda al lavoro di Conti et al. (2013) nel presente Convegno.

Figura 1 - Schema sintetico della procedura per la determinazione della caratteristica di pericolo H14 per i rifiuti secondo l'ADR/CLP.



## Conclusioni

Il quadro normativo relativo alla definizione della caratteristica di pericolo H14, è sostanzialmente definito con le modifiche al DLgs 152/2006 introdotte dal DL 2/2012 che prevedono l'applicazione della metodologia descritta nell'ADR. Tuttavia, come abbiamo cercato di evidenziare nella discussione, rimangono molte questioni di ordine pratico ed applicativo da definire:

- ⇒ Le modalità di preparazione del campione;
- ⇒ La rappresentatività del campione di rifiuto;
- ⇒ La praticabilità del test acuto con pesci;
- ⇒ La possibilità di ampliare le tipologie di saggi applicabili.

Tali questioni richiedono un rigoroso approfondimento tecnico ed una precisa definizione normativa, al fine di garantire un'uniforme applicazione su tutto il territorio nazionale. La sperimentazione che il laboratorio del Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA sta conducendo, potrà fornire un utile indicazione al Ministero dell'Ambiente in sede di emanazione del decreto previsto dal punto 5 dell'Allegato D alla parte IV del DLgs 152/2006, ovvero il provvedimento che dovrebbe definire in dettaglio la procedura da applicare per la determinazione della caratteristica di pericolo H14. Inoltre, sarà necessario attendere anche le proposte che saranno avanzate a livello europeo nel processo di modifica della decisione 2000/532/CE, da cui, si auspica, possano essere date indicazioni più precise, in merito alle modalità di determinazione della ecotossicità di un rifiuto.

### ***Bibliografia.***

- CEN/TR 16110 - Characterization of waste— Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste. 2010.
- CONCAWE, CObservation of Clean Air and Water in Europe, Report No. 01/54. environmental classification of petroleum substances - summary data and rationale. 2001.
- CONCAWE, CObservation of Clean Air and Water in Europe, Report No. 9/11. Acute aquatic toxicity of heavy fuel oils summary of relevant test data. 2011.
- CONCAWE, CObservation of Clean Air and Water in Europe, Report no. 92/56. ecotoxicological testing of petroleum products: test methodology. 1992.
- D. Conti, S. Balzamo, A. Paina, A. Pati, C. Martone. Valutazione della pericolosità per l'ambiente dei rifiuti (H14): definizione della procedura analitica. ISPRA, Fondazione Livorno Euro Mediterranea, Giornate di Studio, V<sup>a</sup> edizione, Livorno 2012.
- ECETOC The European Centre for Ecotoxicology of Chemicals (1996); Monograph, No. 26 - Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances.
- ECHA, Guidance on the Application of the CLP Criteria. Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures.
- D.Lgs. 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. Parte IV e relativi Allegati.
- D.L. 25 gennaio 2012, n. 2, Misure straordinarie e urgenti in materia ambientale. Come convertito in legge, dall'art. 1, comma 1, L. 24 marzo 2012, n. 28.
- D.Lgs. 3 dicembre 2010, n. 205, Disposizioni di attuazione della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive.
- Decisione 3 maggio 2000, n. 2000/532/CE della Commissione che sostituisce la decisione 94/3/CE che istituisce un elenco di rifiuti conformemente all'articolo 1, lettera a), della direttiva 75/442/CEE del Consiglio relativa ai rifiuti e la decisione 94/904/CE del Consiglio che istituisce un elenco di rifiuti pericolosi ai sensi dell'articolo 1, paragrafo 4, della direttiva 91/689/CEE del Consiglio relativa ai rifiuti pericolosi.
- Direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive.
- Direttiva 67/548/CEE del Consiglio, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose.



Direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi.

EN ISO 6341 (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.

EN ISO 8692 (2004) Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with *Desmodesmus subspicatus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*.

EN ISO 11348 1-2-3 (1998). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 1: Method using freshly prepared bacteria. Part 2: Method using liquid dried bacteria. Part 3: Method using freeze dried bacteria.

ISPRA/ISS. Parere. Classificazione dei rifiuti ai fini dell'attribuzione della caratteristica H14 "Ecotossico". 2011.

ISPRA. Rapporto 156/2012. Batterie di test per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti: Stato dell'arte. 2012.

ISPRA. Rapporto 81/2008. Caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti: risultati italiani del circuito d'interconfronto europeo organizzato dall'Agenzia tedesca per la Protezione dell'Ambiente. 2008.

Moser H., Römbke J., Ecotoxicological characterization of Waste. Results and Experiences of an International Ring Test. Springer. 2009

OECD Series on testing and assesment, No. 26 "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures"

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Guideline 201 (2006).

OECD Guidelines for the testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test and Reproduction test. Guideline 202 (1993).

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. Guideline 203 (1992).

OECD Series on Testing and Assessment No. 126, Short guidance on the threshold approach for acute fish toxicity. 2010.

Regolamento CE/1907/2006, del Parlamento e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento CEE/793/93 del Consiglio e il regolamento CE/1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE.

Regolamento CE/440/2008 della Commissione che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento CE/1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH).

Regolamento CE/1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento CE/1907/2006.

UNI EN 14735 (2005) Caratterizzazione dei rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.

UNI EN 12457-2 (2004) Caratterizzazione dei rifiuti - Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi - Parte 2: Prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10 l/kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm (con o senza riduzione delle dimensioni).

# VALUTAZIONE DELLA PERICOLOSITÀ PER L'AMBIENTE DEI RIFIUTI (H14): DEFINIZIONE DELLA PROCEDURA ANALITICA.

*di D. Conti\*, S. Balzamo, A. Paina, A. Pati, C. Martone, V. Bellaria*

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale – Servizio di Metrologia Ambientale – Via di Castel Romano 100 – 00128 Roma  
daniela.conti@isprambiente.it; stefania.balzamo@isprambiente.it;  
andrea.paina@isprambiente.it; alessandra.pati@isprambiente.it;  
cristina.martone@isprambiente.it; vanessa.bellaria@isprambiente.it

---

**Abstract** -. Le modifiche introdotte dal DL 2/2012 per l'attribuzione di pericolo H14 ai rifiuti, hanno aperto la strada ad applicazioni disomogenee della metodologia di valutazione ecotossicologica. Nel presente lavoro, viene descritta la nuova procedura per la preparazione dei campioni di rifiuto (a composizione non determinabile) che devono essere sottoposti ai saggi ecotossicologici con organismi acquatici (Pesci, Daphnia e Algae/Piante acquatiche).

Parole chiave: rifiuti, H14, saggi ecotossicologici

## *Introduzione*

Il DL 2/2012<sup>\*\*</sup>, modificando il punto 5 dell'allegato D alla parte IV del D.lgs 152/2006, ha stabilito, in ambito nazionale, che l'attribuzione della caratteristica di pericolo "Ecotossico" (H14) ai rifiuti, deve essere effettuata secondo le modalità dell'accordo ADR per la classe 9 – M6 e M7.

L'accordo ADR (European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road), è un accordo tra paesi dell'ONU che regola il trasporto internazionale delle merci pericolose su strada. Una delle sue finalità è quella di garantire per tale trasporto un livello accettabile di sicurezza.

I rifiuti s'intendono compresi nella classe 9 di tale accordo, denominata "Materie e oggetti pericolosi diversi", distinta in due sottoclassi: M6 Materie liquide pericolose per l'ambiente acquatico e M7 Materie solide pericolose per l'ambiente acquatico.

I criteri di classificazione dell'ADR, pensati per il trasporto delle merci, non sono tuttavia immediatamente applicabili ai rifiuti. In primo luogo, per i beni e le merci, di solito prodotti intenzionalmente, la composizione è nota nella maggior parte dei casi. Diversamente, nel caso dei rifiuti, spesso la composizione è nota solo parzialmente o non è nota affatto, rendendo di fatto molto complessa la valutazione della pericolosità. D'altro canto, nel caso dei rifiuti, non essendo richiesta l'individuazione dei livelli di pericolo (attraverso le definizioni di "Acuto 1", "Cronico 1" e "Cronico 2"), è possibile semplificare la procedura e verificare, per l'attribuzione della caratteristica H14, solo la presenza del grado di pericolo più basso (Bonato et al., 2012). La valutazione di ecotossicità viene, inoltre, ad essere limitata al solo comparto acquatico.

---

\*Autore di riferimento - D.Conti - Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma - Tel 0650073221-fax 065050519

\*\*Il DL è stato convertito nella legge n. 28/2012

A distanza di qualche mese dall'introduzione della nuova normativa, appare chiaro che la valutazione dell'ecotossicità si presenta problematica e in modo particolare nel caso dei rifiuti a composizione non determinabile\*\* (neanche sulla base delle informazioni relative al ciclo produttivo e ai trattamenti che generano il rifiuto) e per i rifiuti definiti "voci specchio" (mirror entry) per i quali l'esecuzione di saggi ecotossicologici è possibile.

Per rispondere ai nuovi criteri ADR, la metodologia di preparazione del campione di rifiuto, da sottoporre ai saggi, deve essere modificata rispetto alla procedura regolata dalle norme UNI EN 14735 e UNI EN 12457-2, studiate specificamente per i rifiuti e consolidate attraverso un interconfronto internazionale (Moser and Römbke, 2009). Tale metodologia, comportava la preparazione di un lisciviato con un rapporto S/L 1:10 (95± 5 g in 1 L di acqua MilliQ), seguita dalla preparazione di diluizioni seriali utilizzate con una batteria di saggi ecotossicologici. Il dato di tossicità così ottenuto, espresso in termini percentuali, non risulta confrontabile con i criteri per la classificazione di pericolosità espressi, nel regolamento ADR, in mg/L.

Per quanto riguarda i saggi ecotossicologici con organismi acquatici, da applicare ai rifiuti, il regolamento ADR, fa riferimento ai metodi descritti dalle Linee guida OECD:

- n° 203 per la determinazione del valore di LC<sub>50</sub>-96 h con i pesci (o un metodo equivalente).
- n° 202 per la determinazione del valore di EC<sub>50</sub>-48 h con il crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* (o un metodo equivalente).
- n° 201 per la determinazione del valore di ErC<sub>50</sub>-72/96 h con alghe monocellulari d'acqua dolce (o un metodo equivalente).

Se le modifiche alla decisione 2000/532/CE (Paina et al., 2012) andranno nella direzione di applicazione del regolamento CLP (2006/1272/ CE, come modificato dal Regolamento 2011/286/CE) anche nel caso della classificazione dei rifiuti, non ci saranno variazioni per quanto riguarda i metodi dei saggi ecotossicologici. Infatti, tali metodi sono gli stessi dell'Allegato C (C1 Tossicità acuta per i pesci, C2 Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp; C3 Alghe di acqua dolce e cianobatteri, saggio di inibizione della crescita) di cui al Regolamento CE/440/200, cui il CLP fa riferimento.

Al contrario, i valori limite per l'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 nel caso in cui questi saggi ecotossicologici debbano essere eseguiti, subiranno una modifica considerevole. Nella tabella 1 sono mostrati i valori limite di riferimento, secondo ADR (validi allo stato presente) e secondo CLP (in vigore dal 2015).

Tabella 1. Limiti di Riferimento, secondo ADR e CLP, per l'Attribuzione H14 ai Rifiuti per i quali è Obbligatoria l'Esecuzione dei Saggi Ecotossicologici.

Determinazione ecotossicologica	ADR	CLP
LC <sub>50</sub> 96 h (per i pesci)	> 1 a ≤ 10 mg/L e/o	> 10 a ≤ 100 mg/L e/o
EC <sub>50</sub> 48 h (per i crostacei)	> 1 a ≤ 10 mg/L e/o	> 10 a ≤ 100 mg/L e/o
ErC <sub>50</sub> 72-96 h (per alghe)	> 1 a ≤ 10 mg/L	> 10 a ≤ 100 mg/L

La tossicità acuta per l'ambiente acquatico deve essere quindi determinata sulla base di una LC<sub>50</sub> a 96 ore per i pesci, una EC<sub>50</sub> a 48 ore per i crostacei e una ErC<sub>50</sub>

\*\*\*Non determinabile: composizione del rifiuto nota solo parzialmente, cioè non è stato possibile determinare tutte le sostanze presenti o che si può ipotizzare che lo siano in funzione dell'origine del rifiuto oppure, nel caso della presenza di metalli e metalloidi, non sia possibile risalire alla forma chimica in cui essi si trovano (sali, ossidi, idrossidi, ecc.).

72/96 ore per una specie algale. I tre saggi non sono quindi alternativi. Perché il rifiuto sia considerato pericoloso per l'ambiente, è sufficiente che uno solo dei saggi risulti positivo.

In precedenza, il lavoro svolto dal Working Group 7 (della Commissione Tecnica 292) sulle proprietà ecotossicologiche relative alla caratterizzazione dei rifiuti, e i risultati del progetto internazionale "*Valutazione di una batteria di saggi ecotossicologici per la caratterizzazione di rifiuti o eluati di rifiuti mediante circuito d'interconfronto*", avevano condotto alla pubblicazione del Rapporto Tecnico CEN/TR 16110 in cui veniva indicata, per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti, l'applicazione di una batteria minima di tre saggi con organismi acquatici (acuto con batteri bioluminescenti, cronico con alghe verdi monocellulari e acuto con *Daphnia magna*) sul lisciviato e di almeno un saggio con piante superiori (germinazione e crescita) sul rifiuto solido.

L'utilizzo, in base all'approccio attuale ADR/CLP, dei pesci pone numerosi problemi di applicabilità rispetto ai batteri bioluminescenti.

Un'indagine conoscitiva, effettuata presso i laboratori del Sistema Agenziale mediante Rete dei Referenti, riguardante il possesso di competenze specifiche e di strutture laboratoristiche adeguate alla stabulazione dei pesci per l'esecuzione del saggio acuto secondo il metodo C1, ha messo in luce che, oltre ad ISPRA, solo il laboratorio ittologico di ARPA Emilia Romagna sezione provinciale di Ferrara, è in grado di applicare questo saggio. Inoltre, l'utilizzo di animali vertebrati ai fini della sperimentazione scientifica, è regolata dal D.lgs 116 del 27 gennaio 1992 e richiede, da parte dei laboratori, due procedure di autorizzazione presso ASL e Ministero della Salute, nonché l'adozione di strutture logistiche a norma e il controllo veterinario.

Infine, merita sottolineare, che nel caso di esecuzione di nuove prove e analisi ecotossicologiche, il regolamento CLP rimanda all'art. 13 del regolamento 1907/2006/CE (REACH) dove si afferma la necessità di ridurre la sperimentazione su animali vertebrati, ricorrendo, ove possibile, a metodi alternativi.

Alla luce delle considerazioni effettuate, il nuovo DL 2/2012 ha annullato il parere ISPRA/ISS 2011 - *Linee guida per la classificazione dei rifiuti ai fini dell'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 "Ecotossico"* - aprendo la strada ad applicazioni disomogenee della procedura di valutazione ecotossicologica dei rifiuti. Di conseguenza, i laboratori, ARPA/APPA, in occasione della riunione congiunta dei Gruppi di Lavoro (GdL) Interagenziali delle Aree Tematiche A e B\*\*, hanno richiesto ad ISPRA la definizione di nuove Linee Guida di indirizzo per l'applicazione della normativa in materia di classificazione di pericolosità per i rifiuti, con particolare riguardo alla preparazione del campione per i saggi ecotossicologici.

Scopo del presente lavoro è la proposta di una nuova procedura di preparazione del campione di rifiuto da sottoporre ai saggi ecotossicologici con organismi acquatici (tabella 1).

### ***Proposta di una nuova procedura metodologica***

I dati di tossicità ottenibili mediante il test di lisciviazione secondo EN 14735 che prevedono la preparazione di diluizioni seriali del campione, sono espressi in percentuale. Come tali, non sono più compatibili con l'adozione del nuovo approccio ADR/CLP che prevede limiti di riferimento espressi in mg/L. D'altra parte, considerare una diluizione 1:1000 (o 1:10000) di un campione prodotto lisciviando 100 g di rifiuto in 1 L di acqua (secondo EN 14735) equivalente ad un lisciviato

---

\*\* GdL Area A: "Definizione di procedure analitiche ed ecotossicologiche ai fini della valutazione della caratteristica di pericolo H14". GdL Area B: "Classificazione dei rifiuti".

prodotto immergendo 100 mg (o 10 mg) in 1 L di acqua è errato e privo di valore scientifico. Infatti, le concentrazioni delle specie inquinanti rilasciate da un rifiuto, variano rispetto al rapporto L/S utilizzato. Per questo motivo, come riportato nel documento CEN/TS 14405, sono state studiate procedure di lisciviazione con differenti rapporti liquido/solido.

Questo aspetto è stato analizzato sperimentalmente da ISPRA mediante il saggio acuto [24 h] con *Daphnia magna* su un rifiuto costituito da ceneri pesanti da inceneritore. E' stata comparata la tossicità, espressa come percentuale di organismi immobili rispetto al controllo, tra un campione ottenuto con il test di lisciviazione secondo UNI EN 14735 (100 g in 1 L di acqua) e successivamente diluito 1:1000 e un campione ottenuto lisciviando 100 mg in 1 L di acqua. Il valore di 100 mg/l è stato scelto sulla base della considerazione che tutti e tre i metodi ecotossicologici, C1, C2 e C3, prevedono, nel caso di campioni a tossicità sconosciuta, l'esecuzione di un test limite a tale concentrazione. I risultati ottenuti hanno mostrato assenza di tossicità nel caso della diluizione 1:1000 e una tossicità del 100% nel caso del campione di 100 mg/L.

La nuova procedura elaborata da ISPRA e sottoposta, al momento presente, a studi di fattibilità, prevede - sulla base di quanto raccomandato nei documenti tecnici (OECD, 2000; OECD 2001; ECETOC 1996; ECHA 2012) riportati dalle Linee guida dei metodi C1, C2 e C3 - la produzione di singoli campioni acquosi di rifiuto a differenti concentrazioni (Water Accomodated Fractions, WAFs).

Il problema della rappresentatività del campione di rifiuto che viene pesato (valori anche inferiori a 10 mg/L, in base alla tabella 1) e poi disciolto in acqua è stato affrontato applicando l'equazione di Gy [1] che mette in relazione la massa di un (sotto)campione e la variabilità (espressa come coefficiente di variazione, CV) associata al sottocampionamento:

$$[1] \quad m = \frac{I}{6} \pi \cdot d^3 \cdot s \cdot \rho_d \cdot g \cdot \frac{(1-p)}{(VC)^2 \cdot p}$$

L'equazione di Gy, prendendo in considerazione la forma [s], la densità media [ρ], il fattore di correzione della distribuzione granulometrica [g] e la dimensione delle particelle, calcola il campione minimo [m] da prelevare, ad una data granulometria, affinché la sua incertezza rispetto alla rappresentatività si mantenga entro un dato limite di variabilità [CV].

Sulla base di alcune prove di simulazione, è stato da noi ritenuto accettabile un valore di CV pari al 20%. Per stabilire la granulometria del rifiuto si è fatto riferimento alla norma EN 13656:2002 riguardante la preparazione del campione di rifiuto per la misura dei metalli, che prevede una riduzione granulometrica pari a 250 μm. I valori degli altri parametri impostati nell'equazione di Gy sono:

forma	s = 0,5
densità □	ρ = 1,5
distribuzione granulometrica ampia	g = 0,5
elevata eterogeneità	p = 0,001

Nella tabella 2 sono mostrati i valori di massa di campione di prova da utilizzare rispetto alla granulometria, con un livello di incertezza rispetto alla rappresentatività, pari al 20%.

Ne consegue che, con una riduzione granulometrica a 250 μm, il campione minimo da utilizzare è di 80 mg. Al di sotto di questo valore, o si passa ad una riduzione ulteriore della granulometria, oppure diventa necessario aumentare i volumi di lisciviante. Ad esempio, per ottenere un campione di 10 mg, si immergono 80 mg di

rifiuto in 8 L di acqua; per un campione di 8 mg si immergono 80 mg in 10,5 L di acqua, e così via.

*Tabella 2. Valori di Massa di Campione di Rifiuto in Relazione alla Granulometria.*

Granulometria ( $\mu\text{m}$ )	250	125
m del campione di rifiuto (mg)	80	10

In merito ai saggi ecotossicologici – pesci, Daphnia e alghe – la procedura proposta da ISPRA prevede, per tutti e tre, l'applicazione preliminare di un test, come il test limite previsto dai metodi OCSE, alla concentrazione unica di 10 mg/L (o 100 mg/L, secondo CLP) come screening di tossicità, allo scopo, di limitare quanto più possibile, l'esecuzione dei saggi definitivi con il calcolo del valore di LC/EC/ErC<sub>50</sub>, e in modo particolare del saggio con i pesci. Se i test preliminari risultano tutti negativi, il rifiuto può immediatamente essere classificato come non ecotossico. Al contrario, la positività anche per un solo organismo, richiede la determinazione del suo valore mediano di tossicità e se questo risulta inferiore a 10 mg/L (secondo ADR), il rifiuto viene classificato pericoloso per l'ambiente (H14).

Viene proposto lo schema sequenziale mostrato in figura 1.

### ***Conclusioni***

La procedura sinteticamente presentata è, al momento, oggetto di uno studio di fattibilità con diverse tipologie di rifiuto, preparate come materiali di riferimento presso i laboratori del Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA, allo scopo di individuare le problematiche inerenti le diverse fasi della metodologia. Al termine, seguirà la redazione del protocollo dettagliato per la convalida del metodo mediante circuito d'interconfronto aperto a tutti i laboratori del Sistema Agenziale.

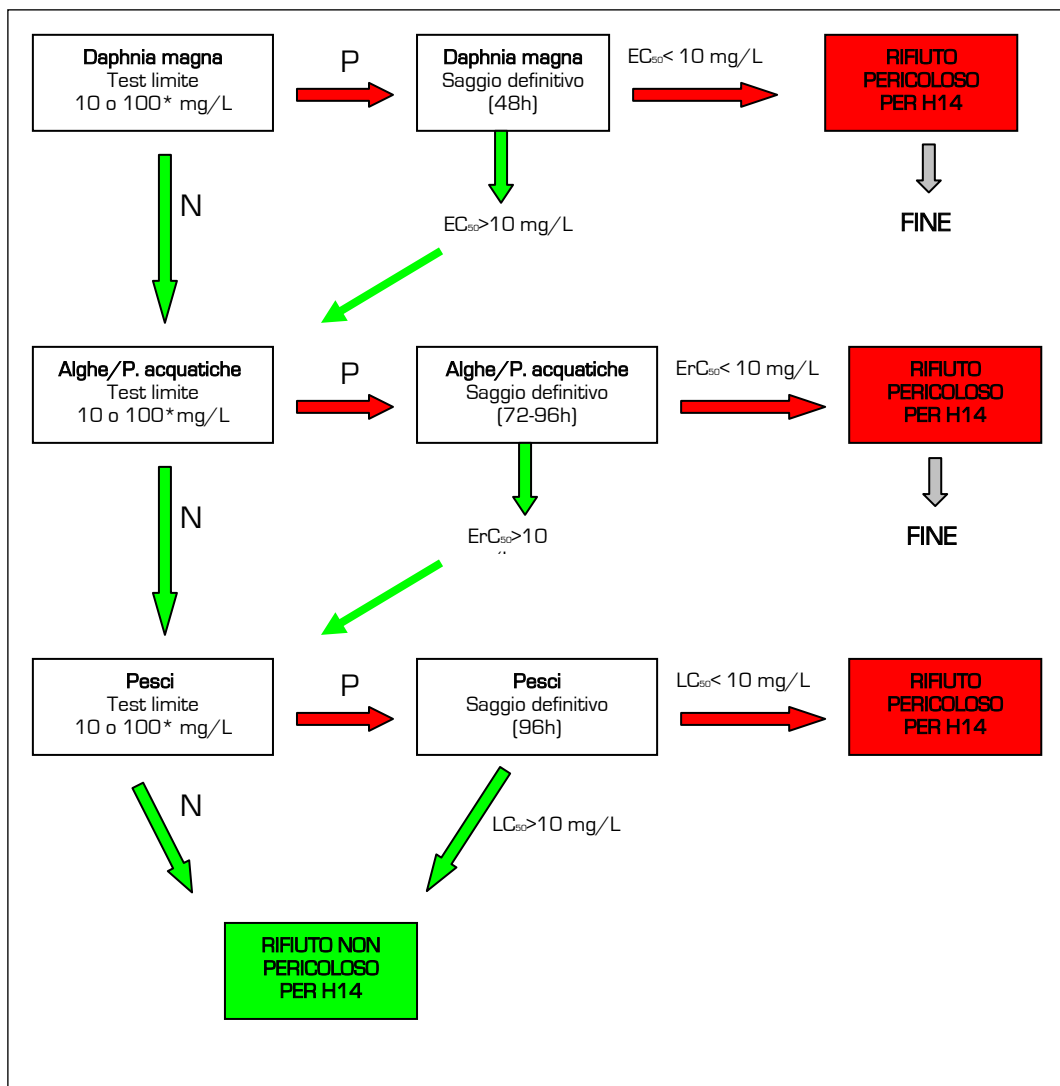


Figura 1. Schema di azioni sequenziali per l'attribuzione di ecotossicità (H14) ai rifiuti in caso di esecuzione dei saggi ecotossicologici. P: positivo, rilevazione di tossicità; N: negativo, mancata rilevazione di tossicità. Legenda: \* Limite valido secondo CLP.

### Bibliografia

- Bonato T., D. De Dominicis, F. Loro e L. Tomiato (2012) Pericolosità per l'ambiente: l'attribuzione ai rifiuti. Ambiente & Sicurezza, 10:74-81.
- CEN/TS 14405 (2004) Characterization of waste - Leaching behaviour tests - Up-flow percolation test (under specific conditions).
- CEN/TR 16110 (2010) Characterization of waste - Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste.
- ECETOC (1996) Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. Monograph n° 26.
- ECHA (2012) Guidance on Application of CLP.

Moser M., and J. Römbke (2009) Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test. Ed. Springer.

OECD (2000) Series on Testing and Assessment. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Number 23.

OECD (2001) Series on Testing and Assessment. Guidance Document on the Use of the Harmonised System for the Classification of Chemicals which are Hazardous for the Aquatic Environment. Number 27.

Paina A., D. Conti, S. Balzamo, A. Pati, C. Martone, V. Bellaria (2012) I rifiuti e la pericolosità per l'ambiente (H14): evoluzione normativa e quadro di riferimento. Comunicazione al presente Congresso.

UNI EN 14735 (2005) Caratterizzazione dei rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.

UNI EN 12457-2 (2004) Caratterizzazione dei rifiuti - Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi- Parte 2: prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10L/Kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm (con o senza riduzione delle dimensioni).



# APPROCCIO INTEGRATO CHIMICO ED ECOTOSSICOLOGICO PER LA GESTIONE AMBIENTALE DI UN ECOSISTEMA FLUVIO-LAGUNARE INFLUENZATO DA PROCESSI INDUSTRIALI ESTRATTIVI

di E. Bartolucci<sup>a</sup>, N. Calace<sup>a</sup>, M. Guerra<sup>a</sup>, G. Moltedo<sup>a</sup>, G. Mulas<sup>b</sup>, F. Onorati<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup> Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale - Roma, Italy - fulvio.onorati@isprambiente.it;

<sup>b</sup> Comune Portoscuso

---

**Abstract** - Il sistema fluvio-lagunare del Boi Cerbus, influenzato dalla presenza di un'intensa attività industriale estrattiva, è stato oggetto di una caratterizzazione chimica ed ecotossicologica volta alla individuazione di valori chimici di riferimento per il comparto sedimenti, finalizzati alla pianificazione di eventuali procedure di intervento e risanamento ambientale. Sono stati definiti 3 livelli chimici di riferimento in ambito fluviale e 2 in quello lagunare a ciascuno dei quali sono state attribuite diverse azioni di intervento da intraprendere nella gestione dei sedimenti, che vanno dalla assenza di azioni fino alla bonifica mediante rimozione dei materiali.

Parole chiave: chemical reference values, ecotoxicity, bioassay, biomarker, sediments

## *Introduzione*

La laguna di Boi Cerbus ricade nel Sito di Interesse Nazionale del Sulcis Iglesiente Guspinese e rappresenta un ambiente costiero fortemente influenzato dalla presenza di un polo industriale (Portovesme), caratterizzato da un'industria prevalentemente estrattiva (produzione di allumina, Piombo, Zinco, Cadmio e derivati).

La laguna di Boi Cerbus occupa un'insenatura racchiusa tra la freccia litoranea di Punta s'Aliga che si estende parallelamente alla costa in direzione nord-sud, e la costa stessa. Dal punto di vista ecologico l'ambiente è rilevante per la presenza di fanerogame marine e di tamericeti (tra i quali si annovera *Tamarix tetrandra*, unica in Europa) ed è un'importante area SIC per la sosta e per la riproduzione di una ricca avifauna.

Nel Maggio del 2009 ISPRA è stata incaricata dal Comune di Portoscuso e dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) di definire la strategia di caratterizzazione ambientale e di individuare strumenti finalizzati alla gestione del territorio, con specifico riferimento all'ambiente lagunare e fluviale. In particolare, per la pianificazione di un eventuale processo di risanamento ambientale, il MATTM ha incaricato ISPRA di fornire, a fini gestionali, dei valori chimici di riferimento per i sedimenti lagunari e fluviali.

## ***Materiali e metodi***

In assenza di un riferimento normativo e di una metodologia univoca riconosciuta a livello scientifico è stata sviluppata una procedura di derivazione di livelli chimici di riferimento basata su un approccio integrato chimico ed ecotossicologico sito-specifico, sulla scorta delle precedenti esperienze ISPRA in ambito UNICHIM e nella definizione dei cosiddetti “valori di intervento” per i SIN perimetrati a mare.

La caratterizzazione dei sedimenti dell'area lagunare e dei corsi d'acqua afferenti ad essa (Rio Flumentepido, Rio Paringianu, Rio Murtas e Canale di Guardia), svolta in due fasi successive, ha previsto l'applicazione di due principali linee di evidenza (chimica ed ecotossicologia), ciascuna delle quali con due livelli di approfondimento. In particolare per l'indagine chimica sono stati ricercati metalli/metalloidi, BTEXs, idrocarburi, IPA, pesticidi, composti alifatici clorurati e alogenati, PCB, diossine e furani, con un approfondimento legato alla determinazione del grado di mobilità dei metalli/metalloidi (speciazione ambientale); l'indagine ecotossicologica ha, invece, previsto l'applicazione di batterie di saggi biologici diversificate in funzione dell'ambiente considerato e di una fase di approfondimento mediante l'applicazione di biomarker su policheti (*Hediste diversicolor*).

La procedura proposta e sperimentata nel sistema fluvio-lagunare di Boi Cerbus prevede il calcolo di un indice di pericolo ecotossicologico (ISPRA, 2011; Manzo *et al.*, 2008; Piva *et al.*, 2011) basato sulla assegnazione, attraverso criteri di ponderazione esperta, di pesi ad alcune principali variabili dei saggi biologici (matrice ambientale saggiata, rilevanza ecologica della specie-test, significatività statistica del risultato, severità dell'end-point). L'indice di pericolo ecotossicologico è stato suddiviso in differenti classi, a ciascuna delle quali è stato associato un livello chimico di riferimento, basato cautelativamente sul 75° percentile della distribuzione dei dati chimici ricadenti in ciascuna di esse.

## ***Risultati e conclusioni***

L'applicazione della procedura ai risultati delle due fasi di caratterizzazione ha consentito di definire 3 livelli chimici di riferimento in ambito fluviale e 2 in quello lagunare (Tabella 1).

A ciascuno dei livelli chimici di riferimento è stata attribuita una diversa azione di intervento da intraprendere nella gestione dei sedimenti, che va dalla assenza di azione alla bonifica mediante rimozione di sedimenti.

In particolare la seconda fase di caratterizzazione mediante biomarker ed analisi chimiche di speciazione ha permesso di confermare la maggior parte dei valori proposti e le relative azioni di intervento.

Tabella 1. Livelli chimici di riferimento (mg kg<sup>-1</sup>) stabiliti per l'area di Boi Cerbus all'interno del SIN del Sulcis Iglesiente Guspinese.

Parametro	Ambiente fluviale			Ambiente lagunare	
	A	B	C	A	B
As	7,0	15	29	12	-
Be	-	-	-	0,7	1
Cd	2	4	37	1,4	-
Co	3	8	9	-	-
Cr	10	25	40	18	29
Cu	-	-	-	17	40
Hg	0,6	1,0	1,2	-	-
Ni	-	-	-	15	21
Pb	112	243	452	110	247
Sn	1,0	3	-	-	-
V	16	36	86	38	58
Zn	290	545	885	600	842
C>12	-	-	-	35	90
IPAtot.	-	-	-	0,15	0,72
Diossine (TE)	-	-	-	0,88	1,31

### ***Bibliografia***

Manzo, S., F. De Nicola, F. De Luca Picione, G. Maisto, A. Alfani (2008) Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests, *Chemosphere*, vol. 71: 1937–1944;

ISPRA, 2011. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. A cura di Baudo R., Faimali M., Onorati F., Pellegrini D. ISPRA, Manuali e Linee Guida 67/2011 (ISBN: 978-88-448-0498-5), 141 pp.

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

# EFFLUENT FROM ANAEROBIC TREATMENT OF ORGANIC WASTE: ECOTOXICITY STUDY AND REUSE AS MICROALGAE MEDIUM

by S. Buono, A.L. Langellotti\*, M. Massa, A. Martello, O. Pepe, V. Fogliano

CRIAcq Research Centre - University of Naples Federico II, Portici - Italy  
acquacoltura.criacq@unina.it

---

**Abstract** -. The possibility to use Anaerobically Digested Effluents (ADEs) for *Arthrospira maxima* production was investigated using three ADEs from Experimental Digesters (ADE-ED) and one from a municipal Anaerobic Digester (ADE-MD). Preliminary ecotoxicity assays on *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata* were performed. ADE-MD showed high toxicity with an EC50 for *D. magna* and *P. subcapitata* at a concentration lower than 0.003%, while for ADE-ED samples the most sensitive organism was *P. subcapitata* with an EC50 value of 0.10%.

*A. maxima* is able to grow in 1% ADE-ED and 0,1% ADE-MD showing a productivity of 98.6 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> with ADE-MD and 86.2 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> with ADE-ED. Despite the high ADEs toxicity *A. maxima* had in ADEs a productivity not significantly different to that observed in the control medium (98.11 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>).

Keywords: anaerobic digestion waste, ecotoxicity, *A. maxima*

## Introduction

Anaerobic digestion (AD) converts organic waste into biogas via microbial consortia under oxygen-free conditions, making AD one of the few technologies that both produce energy and treat municipal organic waste. The effluent originated from AD process has high concentrations of nutrients, particularly nitrogen and phosphorus, essential for photosynthetic organisms growth, but is not suitable for direct disposal or application due to high chemical and biological oxygen demand, low dissolved oxygen, odour issues and its potential toxicity.

In Europe ecotoxicological assessment of wastes is a regulatory requirement, Council Directive 91/689/EEC (EEC, 1991) defines 14 criteria for the characterization of hazardous wastes. The criterion H14 "ecotoxic" of Annex III renders "substances and preparations which present or may present immediate or delayed risks for one or more sectors of the environment" as hazardous waste. This statement is not sufficient for a clear evaluation of this property.

The H14 property was considered by experts as a conclusive factor for deciding the fate of more than 80% of hazardous wastes (Méhu *et al.*, 2004). Notwithstanding the preponderance of this property, no procedure has been yet validated to assess the ecotoxicological characterization of wastes. Moreover, the European Waste List contains more than 250 mirror entries, for which the classification as ecotoxic or non-ecotoxic is left open, thus reinforcing the necessity of developing a strategy for assessing the hazardous properties of wastes.

The effluent utilized in this research has the European Waste Code (EWC) 19 06 03 "liquor from anaerobic treatment of municipal waste" and not has a mirror code, being considered not dangerous per se (Commission Decision 2001/118/EC, 2001).

Ecotoxicity can be estimated by using chemical and biological based approaches. Results from chemical analysis can be used for ecotoxicological assessments based on information of the substances identified, including properties of the chemicals. This information is often scarce (if it exists at all) and does not include possible interactions between chemicals (Ferrari *et al.*, 1999). Furthermore, an exhaustive identification and quantification of substances is impractical. Bioassays integrate the effects of all contaminants including additive, antagonistic and synergistic effects and they are sensitive to the bioavailable fraction of the wastes. Therefore, ecotoxicological testing may be a pragmatic approach for assessing the intrinsic toxicity of wastes as a complement to chemical analysis. A critical aspect of ecotoxicological tests is the unrealistic representation of an ecosystem by means of a single organism. In fact, it is difficult to predict the impact on other species because they have different sensitivities to the same pollutant. Therefore, the application of a battery of tests with organisms belonging to different trophic levels is recommended. Ecotoxicological studies on ADEs are relatively scarce (Wilke *et al.*, 2008). All of these studies adapted test protocols used for ecotoxicological characterization of chemicals and waste waters. They were largely focused on waste and landfill leachates (Clement *et al.*, 1997; Wundram *et al.*, 1996).

These effluents have the potential to cause deleterious effects on living organisms and therefore they must be subjected to various ecotoxicological studies and monitoring programs in order to protect the environment.

The ecotoxicity determination of these effluents can be utilized to define the possible reuse of their nutrients as growth medium for algae production.

Municipal organic wastes such as the percolate from AD contains all required nutrients and could be excellent low cost algae cultivation medium. At the moment only some animal organic wastes showed to be an effective growth medium for algae (Wilkie and Mulbry, 2002; Kebede-Westhead *et al.*, 2006; Chinnasamy *et al.*, 2010).

The aim of the present study was therefore to evaluate the ecotoxicity of Anaerobic Digestion Effluents (ADEs) and the possibility to use them as microalgae growth medium.

## **Materials and methods**

### *Anaerobically Digested organic municipal waste Effluent (ADE)*

Three ADE samples used in the study were collected from *Experimental Digesters (ADE-ED: B7, B8 and B10)* and one from an *Anaerobic Digester plant of Organic Fraction of Municipal Solid Waste (ADE-MD)*. Collected samples were transported and stored at 4°C, then centrifuged for 12 min at 10.000 g and the supernatant used for ecotoxicity bioassays and algae growth tests.

According to the EWC this kind of waste is registered with the code 19 06 03 "liquor from anaerobic treatment of municipal waste" and is not classified as hazardous per se.

### *Ecotoxicity assays*

The ecotoxicity was evaluated by performing a battery of tests with organisms belonging to different trophic levels and using ISO standards methods: *D. magna* (UNI

EN ISO 6341:2011), *P. subcapitata* (UNI EN ISO 8692: 2005), *V. fischeri* (UNI EN ISO 11348:2009). The EC50, EC20 and EC1 were calculated using the Linear Interpolation Method (Inhibition Concentration procedure or ICp) (Cesar *et al.*, 2004; US EPA, 1993). The bootstrap method is used to obtain the 95% confidence interval, because standard statistical methods for calculating confidence intervals are not applicable. Analysis of variance (ANOVA) was applied, using raw data, to test for significant differences in effects among treatments (significance level was always set at  $\alpha = 0.05$ ).

#### *A. maxima* growth test

*A. maxima* (SAG 84.79 strain) culture was obtained from University of Gottingen (Germany) and used as test organism. It was grown and maintained routinely in Zarrouk medium (Zarrouk, 1966) in standard conditions.

On the basis of ecotoxicity results, growth media formulated using ADEs were used at 1 and 0.1% concentration respectively for ADE-ED and ADE-MD. The ADEs were diluted with distilled water enriched only with sodium bicarbonate. For comparison of growth parameters, Zarrouk medium was used as control. The cultures were agitated on orbital shaker keeping temperature at 30°C and light intensity at 4500 lux for nine days. Growth in the different samples was monitored daily by measuring OD at 560 nm and dry weight.

### **Results and discussion**

#### *Ecotoxicology study*

The ecotoxicological effects of ADE-EDs (B7, B8 and B10) originated from experimental anaerobic digesters were reported in table 1 in terms of EC50, EC20 and EC1.

*Table 1. Ecotoxicological effects of AED-EDs expressed in terms of EC50, EC20 and EC1\*.*

Sample	Ecotoxicological test	EC50 (%)	EC20 (%)	EC1 (%)
<b>B7</b>	<i>P.subcapitata</i>	0.087-0.088	0.077-0.080	0.003-0.075
<b>B7</b>	<i>D. magna</i>	0.200-0.410	0.063-0.065	0.012-0.013
<b>B8</b>	<i>P.subcapitata</i>	0.004-0.006	0.002-0.005	N.D.
<b>B8</b>	<i>D. magna</i>	0.650-0.670	0.400-0.630	0.115-0.600
<b>B10</b>	<i>P.subcapitata</i>	0.088-0.253	0.038-0.161	0.002-0.103
<b>B10</b>	<i>D. magna</i>	1.600-7.750	0.950-1.450	0.515-1.022

\*EC50s, EC20s and EC1s were estimated with the EPA ICp procedure (US EPA 1993). Values are the upper and lower limits of 95% confidence interval.

Three ADE-EDs at a 1% concentration for microtox showed a moderate toxicity between 0-30%. The most sensible organism was *P. subcapitata* with an EC50 value ranging from 0.004 to 0.25% for ADE-ED samples. Eutrophic effects were registered at very low concentration below a range among 0.1 and 0.001%.

The most toxic sample for the all organisms utilized was ADE-MD that induced a 50% effect at a concentration below to 0.003%.

The most toxic effects observed for ADE-MD was probably due to the differentiation level of organic waste input, that for municipal plant can present a grade of impurity.

At the moment literature ecotoxicity data of ADEs are very scarce, then to compare the ecotoxicological results we had to consider the studies on ecotoxicological effects observed for leachates of different kind of waste treatments. Kalcikova *et al.* (2011), evaluating the hazardous impact of landfill leachates before and after biological treatment with three different organisms (*Lemna minor*, *D. magna* and *V. fischeri*), observed that *L. minor* was the most sensible organism while the bacterium, *V. fischeri* did not show significant sensitivity to any leachate samples probably because this organism thrives in ecosystems containing a higher concentration of salts and thus it has high tolerance towards landfill leachates. This have been also confirmed by several authors as less sensitive organisms to landfill leachates in comparison with daphnids (Zgajnar Gotvajn *et al.*, 2009, Bortolotto *et al.*, 2009). A different result was reached by Zgajnar *et al.* (2009), that studied the ecotoxicology of raw landfill leachates and observed that the more sensible organisms was *V. fischeri* with an EC50 value ranging from 0.7 to 11.0 %. Very interesting was the research conducted by Pandard *et al.* (2006) in which a battery of bioassays was selected for ecotoxicological characterization of different wastes within the context of waste classification (Hazardous Waste Council Directive 91/689/EEC), and focused on “ecotoxic” property (H14). In this research the more sensible organism was *Ceriodaphnia dubia* followed by *P. subcapitata*.

#### *A. maxima* growth on ADEs

The *A. maxima* growth curves for all the samples analyzed were reported in figure 1. Control productivity was 98.11 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and it was in line with literature data (Fatma *et al.*, 1994; Xin *et al.*, 2011).

The productivity data obtained for ADE-EDs (86.17 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and for ADE-MD (98.6 mgL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) were not statistically different from the control.

*A. maxima* showed a significant biomass productivity in 1% and 0.1% (v/v) concentration of ADE-EDs and ADE-MD respectively.

Kaushik *et al.* (2006) carried out growth test with *Arthrospira* on leachate from AD of distillery waste and the biomass produced in the sample diluted at 50% was significantly greater than in the standard medium, respectively of 1.23 mgml<sup>-1</sup> compared to 0.78 mgml<sup>-1</sup>. Murugan *et al.* (2012) conducted a similar study, observing that the optimum growth for *A. platensis* occurred at a concentration of 7.5%. Furthermore, Gantar *et al.* (1991) carried out tests of *A. platensis* growth on leachates from pig farms, using concentrations from 10 to 50% and the optimum dilution percentage was 20%. Manikandavelu *et al.* (2009) found that waste from pig dung at a concentration of 10% improved the growth of *A. platensis*.

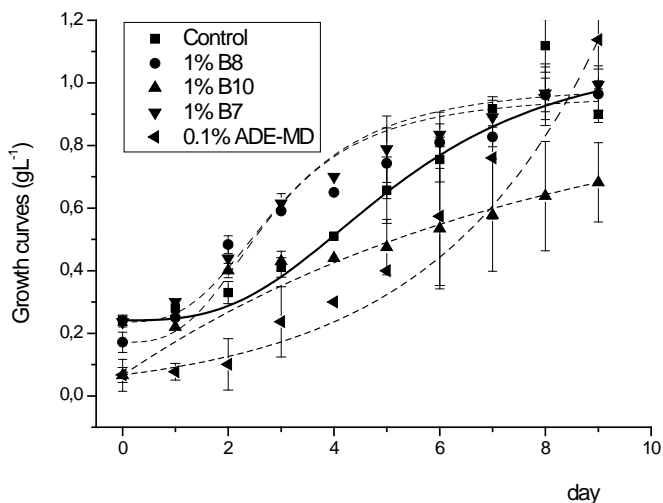


Figure 1. Growth curves for ADEs reported as  $gL^{-1}$  on day ( $\pm SD$ )

### Conclusion

The aim of our study was to assess ecotoxicity and reuse of anaerobically digested effluent of household organic waste [experimental and real].

The hazard for aquatic environment of ADEs was evaluated and the main conclusions and suggestions for future work are as follow:

- A battery of biotests containing different trophic levels of the food chain (decomposers, producers and consumers) might allow to achieve appropriate assessment of the effect of ADEs on the environment. Microalgae *P. subcapitata* was identified as the most sensitive organism, with *Daphnia magna* also showing higher sensitivity to investigated AD leachates. *V. fischeri* showed a lower sensitivity to ADEs.
- Despite the potential ecotoxicity of the leachates, *A. maxima* showed sustainable growth against variation in LADs composition and respect to the control medium, thus prove to be a suitable candidate for large scale utilization of ADEs from anaerobic digestion with simultaneous production of renewable biomass for bioenergy and agricultural applications.

### Reference

- Bortolotto T., J.B. Bertoldo, F. Zanetta de Silveira, T.M. Defaveri, J. Silvano, C.T. Pich (2009). Evaluation of the toxicity and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 28:288–293.
- Cesar A., A. Marin, L. Marin-Guirao, R. Vita (2004) Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portman Bay. *Sci Mar*, vol. 68:205–213
- Chinnasamy S., A. Bhatnagar, R.W. Hunt, K.C. Das (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour. Technol.*, vol. 101: 3097–3105.



Clement B., C. Janssen, A. Le Du-Delepiepierre (1997) Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 2. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests. *Chemosphere*, vol. 35: 2783–2796.

Commission Decision, 2001. 2001/118/EC of 16 January 2001 amending Decision 2000/532/EC as regards the list of wastes. *Off. J. Eur. Commun. L Legis.* 47, 0001–31 [16/2/2001].

Council Directive 91/689/EEC of 12 December 1991 on hazardous waste. *Off J Eur Communities, L, Legis* 1991;377: 0020-0027 [31/12/1991].

Fatma T, Sarada R and Venkataraman LV (1994). Evaluation of selected strains of *Spirulina* for their constituents. *Phykos* 33:89–97

Ferrari B., C.M. Radetski, A.M. Veber, J.F. Ferard (1999) Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid- and solidphase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 18: 1195–1202.

Gantar, M., Obreht. Z and Dalmacija. B. (1991). Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Bioresource technology*, 36 (2): 167-171.

Gotvajn Zgajnar A., T. Ti ler Zagorc, J. Kon (2009) Comparison of different treatment strategies for industrial landfill leachate. *J. Hazard. Mater.*, vol 162: 1446–1456

Méhu J., C. Bazin, L. Grelier-Volatier (2004) Classification réglementaire et écocompatibilité des déchets. *Techniques de l'ingénieur; G 2030*: 1-10.

Mahadevaswamy M., V. Venkataraman. (1986) Bioconversion of poultry droppings for biogas and algal production. *Agric. Wastes*, vol. 18: 93–101.

Mallick N. (2003) Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals* , vol. 15:377–390.

Manikandavelu D., T. Murugan (2009) Utilization of swine dung in *Spirulina* production and isolation of phycocyanin. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*, 5 (4):171-173.

Murugan T., D. Manikandavelu, P. Saranraj (2012) Growth and Bio-Pigment Production of Three Microalgal Species in Organic and Inorganic Media and Determination of Generation Time – A Comparative Study. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(1):140-145

Kalíková G., M. Vávrová, J. Zagorc-Konan and A. Gajnar Gotvajn (2011) Evaluation of the hazardous impact of landfill leachates by toxicity and biodegradability tests. *Environmental Technology*, vol. 32: 1345–1353.

Kaushik R., R. Prasanna, H.C. Joshi, (2006) Utilization of anaerobically digested distillery effluent for the production of *Spirulina platensis* (ARM 730). *J of Sci & Ind.Res.*, 65: 521-525.

Kebede-Westhead E., C. Pizarro, W.Mulbry (2006) Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates. *J. Appl. Phycol.*, vol. 18: 41–46.

Pandard P., J. Devillers, A.M. Charissou, V. Poulsen, M.J. Jourdain, J.F. Féraud, C. Grand, A. Bispo (2006) Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the Total Environment*, vol. 363: 114–125

Priya J.A., P.S. Rao, Y. Vijaya, A.S. Reddy, A. Krishnaiah (2007) Biosorption of chromium (VI), nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solutions using: *Pithophora* algae. *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 89: 421-442.

UNI EN ISO 8692 (2005) Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae

UNI EN ISO 6341 (1999) Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test.

UNI EN ISO 11348: (2009). Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)

US EPA (1993) A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (IC<sub>p</sub>) approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 03-93. Environmental Research Laboratory, Duluth

Wilkie A.C., W. Mulbry (2002) Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. *Bioresour. Technol.*, vol. 84: 81-91.

Wilke B.M., F. Riepert, C. Koch, T. Kuhne. (2008) Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 70: 283-293

Wundram, M., D. Selmar, M. Bahadir (1996) A new phytotoxicity test based on the inhibition of algal photosynthesis enables the assessment of hazardous leachates from waste disposals in salt mines. *Chemosphere*, vol. 32: 1623-1631.

Xin Yuana, Amit Kumarb, Ashish K. Sahuc, Sarina J. Ergasd (2011) Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, vol 102 (3): 3234-3239

Zarrouk C. (1966) Contribution a l'etude d' une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch. et Gardner) Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, France.

# ECOTOXICOLOGY IN ENVIRONMENTAL ASSESSMENT: PILOT PROJECT FOR PESTICIDE POTENTIAL VULNERABILITY ASSESSMENT OF NATURA 2000 SITES

*by C. Jacomini\*, F. Araneo, V. Bellucci, P.M. Bianco, N. Calace, L. Campana, M. Di Leginio, F. Floccia, F. Fumanti, L.C. Lorusso, S. Lucci, G.L. Maschio, P. Paris, S. Ursino*

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Roma, Italy.-  
carlo.jacomini@isprambiente.it

---

**Abstract** - Conservation measures might be in conflict with current land management, particularly where intensive agriculture is supposed to generate pesticide dispersal, creating possible threats, and potentially affecting protected areas, habitats and species. Concern on these threats is actually calling for standard procedures to assess these impacts on Natura 2000 sites. ISPRA has recently proposed to the Ministry of the Environment a national project to assess the pesticide potential vulnerability of Italian Natura 2000 sites. A three-tiers methodology to estimate and ascertain interrelations between Natura 2000 sites and pesticide utilisation has been proposed, whose first step will be assessing the degree of risk associated with current data. Second- and third-tier investigations, which should involve a national team of experts from different institutions, might be advised, also briefly anticipated. The proposed methodology establishes an objective and site-specific protocol for ecological risk assessment, based on available data and affording for the first time a national approach to the problem. Standardisation and normalisation of methodology and results, might lead to a unified ecological and ecotoxicological protocol to assess the potential and actual impacts of pesticides on Natura 2000 sites and other protected areas.

Keywords: ecological risk assessment, Natura 2000 sites, pesticide impact, biological indicators, Italy.

## ***Introduction***

Pesticides are widely used in agriculture to increase crop yield and improve harvest quality. Nevertheless, they affect non-target soil organisms by decreasing enzyme activity, soil biodiversity (affecting both richness and evenness), and changing the overall ecological community structure. Pesticide impacts might pose hazards if intensive agricultural activities fall nearby or within Natura 2000 (N2K) areas, which are characterised by peculiar ecological aspects and protected for their natural value.

Natura 2000 is an EU wide network of nature protection areas established under the 1992 Habitats Directive to assure the long-term survival of Europe's most valuable and threatened species and habitats. It is comprised of Special Areas of Conservation (SAC) designated by Member States under the Habitats Directive, and also incorporates Special Protection Areas (SPAs) which they designate under the Birds

Directive. Italy identified and defined over 2,500 sites, protecting a variety of habitats and ecosystems covering over 21 % of its surface. Several of these sites, collectively designed as Natura 2000 areas, might be influenced by pesticides and other diffuse pollutants deriving from intensive agricultural activities.

To address these issues, and propose a methodology to assess the ecological implications in using biocides and other hazardous xenobiotics nearby or within protected areas, it is paramount to investigate not only the chemical and physical implications, but also the biological ones. Patterns of species distribution and community composition, as a general rule, play a fundamental role in soil sustainability and biodiversity conservation. Ecotoxicology, on the other hand, might provide useful insights and contribute to the correct investigation of potentially contaminated areas.

Scarce attention has since now been paid to delineate which (and how) factors affect the structure of above- and belowground communities, due to their complexity and the problems involved in the identification and ecological characterisation of most soil organisms. Moreover, the extreme diversity of habitats in Italy poses challenges in the analysis of ecological communities and hinders a simple correlation used in other countries to address hazard assessment and ecological risk analyses.

Literature results show that soil biota can receive both direct and indirect pesticide impacts. Therefore, well designed and implemented soil biodiversity analyses produce reliable and fast responses to contaminants and could be suitable to act as early warning signal and as biological indicators, highlighting some of the negative effects of pesticides. However, soils are physically, chemically and biologically complex habitats, supporting a great diversity of organisms, and it might be risky to apply methodologies which do not take into consideration the whole complexity of soil communities. For instance, analysis of quantitative changes in the composition of soil fauna may provide useful insights and serve as another important and sensitive indicator of both short- and long-term changes in soil quality.

For this reason, ISPRA proposed a thorough procedure to assess the potential vulnerability of N2K areas to pesticides, by means of multidisciplinary analysis integrating all the available information on agricultural pressure, biodiversity composition and related pesticide hazard.

### ***Project summary***

A project is being launched under a first financing aid from the Ministry of the Environment (MATTM). Hereby, we summarise the main components of the project, which cannot be publically spread until the final report will be delivered (Dec. 2013). The first step that ISPRA considered in the MATTM pesticide impact potential vulnerability of Natura 2000 sites project is a comprehensive and thorough collation of available data-sets within ISPRA and from other Institutions and Research Centres. Merging GIS, statistical analysis and nation-wide, long time-series of information on the different aspects of the problem, a first classification of pesticide potential vulnerability of Italian N2K areas will be provided.

Several informative layers will be used to cluster N2K areas based on actual soil use (agricultural soil), characteristic species and habitats, presence of particularly sensitive-to-pesticides ecological community, and pesticide utilisation in these areas. Different criteria can be used to classify the sensitivity of different communities to pesticides, nevertheless all criteria are based on the evaluation of toxic response of organisms (ecotoxicological methods). Results of this first-tier work will consist of identification and classification of N2K sites impacted by pesticides utilisation. The aim will be to establish general criteria to classify these areas by taking into account:

- Soil characteristics, farmland management techniques, ecological limiting factors and biodiversity changes among different areas;

- Main ecotoxicological effects of pesticides focussing on groups of active substances that have been authorised and sold on Italian territory;
- Species and habitats of Community interest;

A field verification on pilot areas identified among the over 2,500 Italian N2K sites will also be performed to assess the quality of assessments. Critical points already emerging through these analyses are showing how soil biodiversity need a stronger effort in investigation and monitoring, while the huge number of pesticides applied in intensive agriculture, the turnover of agriculture commercial products, and the complex analysis of their effects on the environment make urgent a classification on the basis of ecotoxicological substance features.

Commonly used criteria are generally based on the concept of a toxicity/exposure ratio, calculated as the ratio between a toxicological end-point and a predicted environmental concentration (TEC and PEC) for terrestrial organisms. This ratio should be calculated for site-specific soil analyses, to establish critical thresholds that indicate the need for restrictions, as well as for further management actions to protect N2K areas.

Second-tier analyses might require longer terms for accomplishments. In red-flag areas (those which require stronger investigation or show problems already acquainted in the tier-one phase) specific analyses will be performed in restricted sites, considered representative of most common and peculiar situations.

A standard protocol will be applied to collect information on the environment, the pesticide utilisation, the ecological characteristics of the sites. Peculiar communities and specific bioindicators might also be applied to restrict the number of assays. On third-tier phase, a specific analysis of metabolic fate and different impacts of pesticides on soil biodiversity will be performed, to address direct and indirect effects and assess bioavailability. An index of environmental distress will also be produced.

# APPLICAZIONE DELLE GUIDE TECNICHE PER L'ATTUAZIONE DEL REGOLAMENTO REACH ALL'ANALISI DI RISCHIO AMBIENTALE: ESEMPIO DELLO SCARICO DI ARSENICO E SUOI COMPOSTI NELLE ACQUE MARINE.

*di C. Milillo*

Libera professionista – c.milillo@libero.it

---

**Abstract** -. L'arsenico e i suoi composti sono classificati dalla normativa europea pericolosi per l'ambiente acquatico anche con effetti di lunga durata; inoltre il triossido e il pentossido di arsenico sono stati inclusi nell'Allegato XIV del Regolamento REACH, pertanto dal 21/05/15 non potranno essere utilizzati nell'Unione Europea senza l'autorizzazione dell'ECHA. In questo lavoro è stata effettuata un'analisi di rischio ambientale relativo allo scarico di arsenico nelle acque marine a partire dai dati di emissione di un'impresa soggetta alla normativa IPPC e seguendo le indicazioni delle Guide Tecniche per l'attuazione del Regolamento REACH. I risultati dimostrano che le concentrazioni previste di arsenico nello scarico e nell'acqua di mare sono confrontabili con quelle rilevate dai monitoraggi di ARPAT e risultano minori della concentrazione prevedibile di non effetto per l'ambiente.

Parole chiave: analisi di rischio, Regolamento REACH, arsenico

## *Introduzione*

Il Regolamento n. 1907/2006 (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) ha l'obiettivo di assicurare un maggiore livello di protezione della salute umana e dell'ambiente, migliorando la conoscenza dei rischi derivanti dalle sostanze chimiche. Nell'Allegato XIV del REACH sono comprese "sostanze estremamente problematiche" per la salute umana o l'ambiente, che non possono essere utilizzate o immesse sul mercato se non sono state autorizzate dall'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA). L'autorizzazione è rilasciata se il rischio per la salute umana e per l'ambiente che l'uso della sostanza comporta è adeguatamente controllato, come dimostrato dalla valutazione della sicurezza chimica (CSA).

Nell'ultima modifica dell'allegato XIV del Regolamento REACH, pubblicata il 14 febbraio scorso (REGOLAMENTO (UE) N. 125/2012), sono state inserite fra le sostanze soggette ad autorizzazione il triossido e il pentossido di arsenico, che dunque non potranno più essere utilizzati o importati nell'Unione Europea senza l'autorizzazione dell'ECHA oltre il 21/05/15. Inoltre l'Allegato XVII del Regolamento REACH prevede alcuni divieti di utilizzo dei composti dell'arsenico.

L'Arsenico (As) è un metalloide la cui presenza è ampiamente rilevabile in tutte le matrici ambientali e che viene utilizzato in molti prodotti e processi industriali e quindi immesso nell'ambiente (aria, acqua e suolo) tramite rifiuti ed emissioni.

Lo scopo di questo lavoro è di fornire un esempio di valutazione della sicurezza chimica dell'arsenico e dei suoi composti secondo le Guide tecniche dell'ECHA,

applicata al comparto ambientale acquatico ed effettuata non partendo dalla quantità utilizzata e dalle modalità d'uso di un singolo operatore, ma direttamente dai dati di emissione in acqua relativi a un'impresa ricadente nell'applicazione della normativa IPPC (Integrated Pollution Prevention and Control), dati pubblicati in quanto superiori alla soglia di emissione di 5 kg/anno. Come esempio di impresa è stata scelta la ditta Solvay, in Provincia di Livorno, che effettua gli scarichi liquidi in mare nei pressi di Rosignano.

### Materiali e metodi

Come schematizzato in figura 1, la valutazione della sicurezza chimica di una sostanza comprende le seguenti fasi:

- la **valutazione dei pericoli (hazard assessment)**; se la sostanza risulta pericolosa, la CSA deve anche comprendere:
- la **valutazione dell'esposizione (exposure assessment)**;
- la **caratterizzazione del rischio (risk characterization)**. I rischi si ritengono controllati quando i livelli d'esposizione stimati non superano i livelli prevedibili privi di effetto.

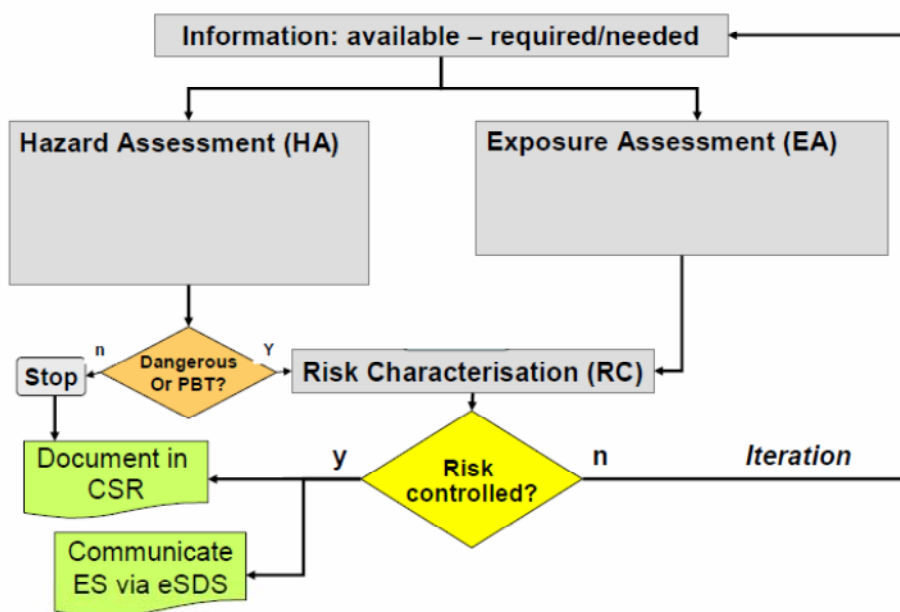


Figura 1. Schema delle fasi della CSA, da ECHA (2008c)

### Risultati

#### Valutazione dei pericoli

Questa fase prevede la raccolta e la valutazione delle informazioni sulla sostanza, l'identificazione dei pericoli per l'ambiente, e la determinazione delle concentrazioni prevedibili senza effetto (PNEC), cioè delle concentrazioni di una sostanza chimica nel compartimento ambientale di interesse al di sotto della quale è probabile che non si verifichino effetti dannosi per l'ecosistema e i suoi organismi durante l'esposizione a lungo o a breve termine.

Nella CSA applicata ai metalli occorre però tenere presente che questi possono esistere in differenti stati di ossidazione e associati a diversi anioni, cationi o ad altri

agenti assorbenti, quindi bisogna tenere conto della loro speciazione e assorbimento/desorbimento, dunque la loro biodisponibilità dipende dalle caratteristiche ambientali (ECHA, 2008a).

L'arsenico esiste in differenti gradi di ossidazione: -3, 0, +3, +5.

Nelle acque naturali è predominante l'arsenico inorganico nelle forme in combinazione con l'ossigeno: arseniti (As III) e arseniati (As V). Nelle acque ben areate, come quelle superficiali, i composti dell'As tendono ad ossidarsi a formare le forme pentavalenti, ("arseniati"), mentre in condizioni anaerobiche, come quelle che si trovano nelle acque profonde, nelle acque interstiziali dei sedimenti e nelle acque sotterranee gli arseniati possono essere ridotti chimicamente ad arseniti che qui sono la forma più stabile (INERIS, 2010). Gli arseniati possono essere rimossi dalla soluzione per adsorbimento sugli idrossidi di ferro, di alluminio e sulle argille, gli arseniti sugli ossidi di ferro e sui solfuri (Ferguson and Gavis, 1972).

In seguito a questi processi, l'As è rimosso dalle acque e depositato nei sedimenti, dove può rimanere indisturbato per molti anni (Nriagu, 1983). L'As legato ai sedimenti può essere rilasciato nella colonna d'acqua con la decomposizione del materiale organico, l'attività biologica o la dissoluzione degli idrossidi di ferro e manganese in condizioni anaerobiche (Nriagu et al., 1987; Belzile, 1988) o di basso pH (Fitz et al., 2003).

L'arsenico inorganico nelle acque può anche essere trasformato da alghe e microrganismi in forme metilate più complesse come l'acido monometilarsenico (MMA), l'acido dimetilarsenico (DMA), l'ossido di trimetilarsina (TMAO), la trimetilarsina (TMA) (INERIS, 2010).

Molti organismi marini possono accumulare arsenico dai sedimenti e dalla colonna d'acqua, ciò nonostante non si riportano casi di biomagnificazione attraverso la catena alimentare (Eisler, 1988).

L'arsenico e i suoi composti sono classificati nel Regolamento CE n. 1272 del 16 dicembre 2008 (cosiddetto Regolamento CLP) relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele, per quanto riguarda i pericoli per l'ambiente, come "Pericolosi per l'ambiente acquatico - pericolo acuto, categoria 1" e "Pericolosi per l'ambiente acquatico - pericolo cronico, categoria 1", a cui corrispondono le Indicazioni di pericolo "H400 altamente tossico per gli organismi acquatici" e "H410 molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata".

Le modalità di azione tossica dell'As in acqua sono la sua capacità di reagire con i gruppi sulfidrici (-SH) delle proteine, dando luogo ad un meccanismo di inibizione enzimatica, o l'interferenza con altri meccanismi come la fosforilazione ossidativa durante la respirazione cellulare (US EPA, 1985).

Per valutare la PNEC, secondo il Capitolo R.10 della Guida ECHA (ECHA, 2008b), bisogna avere a disposizione i dati di tossicità per gli organismi acquatici; si divide poi il più basso valore di tossicità per un pertinente fattore di valutazione (Assessment Factor, AF):

$$PNEC = \frac{NOEC/EC_{50}}{AF} \quad \text{(eq. 1)}$$

I risultati delle prove a lungo termine (espressi come  $EC_{10}/NOEC$ ) sono preferibili a quelli delle prove a breve termine ( $EC/LC_{50}$ ), perché danno un quadro più realistico degli effetti sugli organismi durante il loro intero ciclo di vita; più studi a lungo termine si hanno a disposizione, più piccolo sarà l'AF da utilizzare, come si vede dalla tabella 1 relativa alle acque marine:



Tabella 1. Assessment Factor per calcolare la PNEC relativa alle acque marine

Data set	Assessment factor
Lowest short-term L(E)C50 from freshwater or saltwater representatives of three taxonomic groups (algae, crustaceans and fish) of three trophic levels	10.000 <sup>a)</sup>
Lowest short-term L(E)C50 from freshwater or saltwater representatives of three taxonomic groups (algae, crustaceans and fish) of three trophic levels, + two additional marine taxonomic groups (e.g. echinoderms, molluscs)	1000 <sup>b)</sup>
One long-term result (e.g. EC10 or NOEC) (from freshwater or saltwater crustacean reproduction or fish growth studies)	1000 <sup>b)</sup>
Two long-term results (e.g. EC10 or NOEC) from freshwater or saltwater species representing two trophic levels (algae and/or crustaceans and/or fish)	500 <sup>c)</sup>
Lowest long-term results (e.g. EC10 or NOEC) from three freshwater or saltwater species (normally algae and/or crustaceans and/or fish) representing three trophic levels	100 <sup>d)</sup>
Two long-term results (e.g. EC10 or NOEC) from freshwater or saltwater species representing two trophic levels (algae and/or crustaceans and/or fish) + one long-term result from an additional marine taxonomic group (e.g. echinoderms, molluscs)	50
Lowest long-term results (e.g. EC10 or NOEC) from three freshwater or saltwater species (normally algae and/or crustaceans and/or fish) representing three trophic levels + two long-term results from additional marine taxonomic groups (e.g. echinoderms, molluscs)	10

Il sito del Ministero dell'Ambiente riporta, nel Database Ecotossicologico delle Sostanze Chimiche, due studi cronici sugli organismi acquatici senza specificare lo stato di ossidazione dell'arsenico: uno sull'invertebrato *Pteronarcys dorsata* (No Significant Effect Level a 28 giorni: 1 mg/l) e uno sul pesce di acqua dolce *Oncorhynchus gorbuscha* [LC<sub>100</sub> a 5 giorni: 16 mg/l] [DESC - <http://www.dsa.minambiente.it/SITODESC/EcoTossicologiche.aspx?Id=1067>].

Applicando un AF di 500, poiché sono presenti solo due studi a lungo termine, l'eq. 1 diventa:

$$PNEC = \frac{100\mu\text{g/l}}{50} = 2 \mu\text{g/l}$$

Il report dell'INERIS del 2010 riporta diversi studi ecotossicologici cronici su specie di acqua dolce appartenenti a diversi livelli trofici e due su specie marine; il valore più basso fra questi è quello ottenuto da Vocke nel 1980 sull'alga *Ankistrodesmus falcatus* (NOEC a 14 giorni: 10 µg/l per l'arsenico pentavalente). Applicando un AF di 10, l'eq. 1 diventa:

$$PNEC = \frac{10\mu\text{g/l}}{10} = 1 \mu\text{g/l}$$

Entrambi i valori sono comunque molto bassi, minori della concentrazione media dell'arsenico nelle acque marine che è di 2-3 µg/l [Mance et al 1984]: bisogna dire che gli studi considerati sono molto vecchi e non disponibili direttamente, per cui non è possibile controllare che abbiano rispettato gli standard richiesti dall'ECHA.

Si è quindi scelto di utilizzare un valore di PNEC adottato dalla legislazione inglese per la protezione delle acque, di 25 µg/l per le acque marine, derivato dal più basso LC<sub>50</sub> riportato per i copepodi (508 µg/l), diviso per un AF di 20 [UKTAG, 2008].

L'U.S. EPA ha proposto valori anche maggiori, cioè di 36 µg/l come criterio di qualità per gli effetti cronici

[<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/index.cfm#cmc>].

### Valutazione dell'esposizione

Questa fase comprende il calcolo delle concentrazioni nei diversi comparti ambientali in termini di Predicted Environmental Concentrations (PEC).

Secondo il Capitolo R.16 della Guida ECHA (ECHA, 2010), la concentrazione nelle acque marine di una sostanza riferita a uno specifico sito di scarico è data dalla seguente equazione:

$$Clocal_{seawater} = \frac{Clocal_{eff}}{(1+Kp_{susp} * SUSP_{water} * 10^{-6}) * DILUTION} \quad \text{(eq. 2)}$$

dove

$Clocal_{seawater}$  è la concentrazione della sostanza nelle acque marine in seguito allo scarico in esame, in mg/l

$Clocal_{eff}$  è la concentrazione della sostanza nello scarico, in mg/l

$Kp_{susp}$  è il coefficiente di ripartizione solidi sospesi/acqua, in l/kg

$SUSP_{water}$  è la concentrazione dei solidi sospesi nell'acqua marina, stabilito in 15 mg/l di default

$DILUTION$  è il rapporto di diluizione, stabilito in 100 nelle acque marine di default.

La concentrazione della sostanza nello scarico si può calcolare dal rapporto fra la quantità di sostanza scaricata, in mg/h, e la portata dello scarico, in l/h.

Il fattore  $(1+Kp_{susp} * SUSP_{water} * 10^{-6})$  serve per convertire la concentrazione totale del metallo in concentrazione disciolta e dunque potenzialmente biodisponibile.

Dai dati disponibili nel sito di ARPA Toscana (<http://www.arpat.toscana.it/notizie/comunicatistampa/2012/solvay-scarichi-ed-arsenico>) risulta che nel 2010 la Solvay ha scaricato 1301 kg/anno di As, corrispondenti a 148516 mg/h, con una portata dello scarico di 10000 m<sup>3</sup>/h, corrispondente a 10<sup>7</sup> l/h. Pertanto  $Clocal_{eff}$  risulta di 0,015 mg/l, in linea con la analisi effettuate da ARPAT nello scarico della Solvay fra il 2010 e il

2011 (da 0,02 a 0,09 mg/l) Il valore di  $Kp_{susp}$  nei metalli varia a seconda delle condizioni ambientali (pH, Eh, solidi adsorbenti): non avendo a disposizione i dati ambientali locali si è scelto di utilizzare il valore di 10000 l/kg, secondo quanto riportato dall'U.S.

EPA nel 2005 (log  $Kp = 4$  l/kg, corrispondente alla mediana di più di 200 dati riportati in letteratura, senza specificare lo stato di ossidazione dell'As).

Pertanto l'eq. 2 diventa:

$$Clocal_{seawater} = \frac{0.015}{(1+10000*15*10^{-6})*100} = 1.30 * 10^{-4} \text{ mg/l}$$

Corrispondenti a 0,13 µg/l.

Per il calcolo della PEC locale, si somma la  $Clocal_{seawater}$  calcolata con la concentrazione considerata di background in un generico ambiente (PEC<sub>regional</sub>):

$$PEClocal_{seawater} = Clocal_{seawater} + PECregional_{seawater} \quad \text{(eq. 3)}$$

La PEC<sub>regional,seawater</sub> è stata considerata uguale a 2 µg/l (concentrazione media dell'arsenico nell'acqua di mare).

Pertanto l'eq. 3 diventa:

$$PEClocal_{seawater} = 0,13 + 2 = 2,13 \text{ µg/l.}$$

La concentrazione di arsenico nell'acqua di mare risulta confrontabile con i monitoraggi eseguiti da ARPAT Toscana che non ha mai riscontrato valori maggiori degli standard di qualità per le acque costiere di 5 µg/l.

### *Caratterizzazione del rischio*

Rappresenta la fase finale della valutazione sulla sicurezza chimica. Indica se i rischi derivanti dalla fabbricazione/importazione e dagli usi di una sostanza sono opportunamente controllati e consiste in un confronto delle PNEC con le concentrazioni di esposizione calcolate per l'ambiente (ECHA, 2008c)

$$RCR = \frac{PEC}{PNEC} \quad (\text{eq. 4})$$

dove RCR è il Risk Characterisation Ratio: se questo è minore di 1, il rischio è adeguatamente controllato, altrimenti saranno necessarie ulteriori misure di gestione del rischio che riducano le emissioni della sostanza nell'ambiente.

Nel nostro caso l'eq. 4 diventa:

$$RCR = \frac{2.13}{25} = 0.085$$

### *Discussione e conclusioni*

Come evidenziato nei risultati, il rischio nel caso in esame risulta controllato, dimostrando che non c'è pericolo per l'ambiente derivato dalla specifica emissione nelle acque marine. Inoltre i risultati si sono rivelati confrontabili con i dati di monitoraggio ambientale, dimostrando la validità del metodo.

Seguendo le indicazioni delle guide dell'ECHA si può applicare un procedimento simile riferito a tutti i componenti ambientali: acque interne, sedimenti marini e di acque interne, suolo, sottosuolo, aria, esposizione dei predatori lungo la catena alimentare e dell'uomo attraverso l'ambiente. Inoltre si possono inserire i dati ambientali relativi al sito in esame, permettendo una migliore valutazione della speciazione del metallo. Per gestire questa grande quantità di dati, è molto più agevole utilizzare programmi appositamente predisposti come ECETOC (<http://www.ecetoc.org>), EUSES (<http://ecb.jrc.it/euses>) e CHESAR (<http://chesar.echa.europa.eu>) che, a partire da dati di input relativi alle caratteristiche della sostanza, alla quantità utilizzata e alla modalità con cui è utilizzata nel ciclo produttivo, comprese le misure di gestione del rischio, calcolano i valori di PEC, PNEC e RCR per tutti i comparti ambientali, consentendo di prevedere, anche senza eseguire analisi chimiche degli effluenti o delle matrici ambientali, se il rischio derivato dall'uso di quelle sostanze è adeguatamente controllato o no, aumentando l'ecosostenibilità dei processi produttivi.

### *Bibliografia*

Belzile N. (1988). The fate of arsenic in sediments of the Laurentian Trough. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52, pp.2293-2302.

ECHA (2008a). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. [Appendix R.7.13-2:Environmental risk assessment for metals and metal compounds]. ECHA, Helsinki, Finland.

ECHA (2008b). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. [Chapter R.10:Characterisation of dose [concentration]-response for environment]. ECHA, Helsinki, Finland.

ECHA (2008c). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. (Part E: RiskCharacterisation). ECHA, Helsinki, Finland.

ECHA (2010). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. [Chapter R.16:Environmental Exposure Estimation]. ECHA, Helsinki, Finland.

Eisler R. (1988). Arsenic hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Report 85(1.12).

Ferguson J.F., Gavis J. (1972). A review of the arsenic cycle in natural waters, Water Research Pergamon Press. Vol. 6, pp. 1259-1274.

Fitz W.J., Wenzel W.W., Zhang H., Nurmi J., Štípek K., Fischerová Z., Schweiger P., Köllensperger G., Ma L.Q., Stingeder G. (2003). Rhizosphere characteristics of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and monitoring of phytoremoval efficiency. Environ. Sci. Technol., 37, pp. 5008–5014.

INAIL (2010) Arsenico: contaminazione ed esposizione ambientale. Quaderno informativo ISPESL.

Mance, G., Musselwhite, C. and Brown, V.M. (1984) Proposed Environmental Quality Standards for list II substances in water - Arsenic. Technical Report TR 212.

Nriagu, J.O. (1983) Arsenic enrichment in lakes near the smelters at Sudbury, Ontario. Geochim. Cosmochim. Acta 47: 1523-1526.

Nriagu, J.O., F. Rosa, A. Mudroch, and J. Legault. (1987) Arsenic and selenium mobility in Lake Erie sediments. In: Heavy Metal in the Environment ; International Conference, New Orleans, September 1987, Volume 2. 156-159.

REGOLAMENTO (CE) n. 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE

REGOLAMENTO (UE) N. 125/2012 DELLA COMMISSIONE del 14 febbraio 2012 recante modifica dell'allegato XIV del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche («REACH»).

REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006

UKTAG, United Kingdom's Technical Advisory Group on the Water Framework Directive (2008) Proposals for environmental quality standards for Annex VIII substances, Final Report January 2008.

US EPA (1985). Ambient water quality criteria for arsenic - 1984. U.S. Environ. Protection Agency Rep. 440/5-84-033. 66 pp.

U.S. EPA (2005) Partition Coefficients for Metals in Surface Water, Soil and Waste, EPA/600/R-05/074.

Vocke R.W., Sears K.L., O'Toole J.J. and Wildman R.B. (1980) - Growth response of selected freshwater algae to trace elements and scrubber ash slurry generated by coal-fired power plants. Water Res, 14, 141-150.

# VERIFICA DELLA CONFORMITÀ DI DETERGENTI ALLA NORMATIVA VIGENTE MEDIANTE ANALISI CHIMICO- ECOTOSSICOLOGICHE

di M. Casera<sup>a</sup>, F. Lazzeri<sup>b</sup> \*

<sup>a</sup> Laboratorio biologico provinciale (APPA Bolzano), Laives (Bz), Italia – maddalena.casera@provincia.bz.it

<sup>b</sup> Laboratorio biologico provinciale (APPA Bolzano), Laives (Bz), Italia – francesca.lazzeri@provincia.bz.it

---

**Abstract** - Su richiesta del Ministero della Salute, nel 2009 sono stati avviati dei controlli su alcuni detersivi di 4 ditte produttrici della Provincia di Bolzano, per verificarne la conformità al Regolamento CE n. 648/2004 e normativa vigente. In ciascuna ditta sono stati prelevati 3 campioni di detersivi, per i quali sono stati eseguiti controlli di conformità dell'etichettatura, delle schede tecniche e di sicurezza e la verifica analitica della biodegradabilità, del contenuto in fosforo e dell'ecotossicità. Le analisi ecotossicologiche e del contenuto in fosforo hanno dimostrato per tutti i campioni la conformità di questi parametri ai limiti di legge. Per quanto riguarda invece l'analisi della biodegradabilità completa, per 3 detersivi è stata rilevata una non conformità.

Parole chiave: detersivi, test ecotossicologici, biodegradabilità, fosforo.

## *Introduzione*

In seguito all'entrata in vigore del Regolamento CE n. 648/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio, relativo ai detersivi, che fornisce i criteri tecnici comuni a tutta la Comunità europea per garantire il mercato interno dei detersivi, è stata sentita la necessità di verificare la conformità dei detersivi alla normativa vigente in materia. Le attività di controllo sono state svolte su specifica richiesta da parte del Ministero della Salute, che risulta essere competente, insieme alle regioni ed ai comuni, in materia di vigilanza sui tensioattivi ed i preparati destinati alla detergenza, come stabilito dall'art. 6 del D.P.R. n. 21/2009. A tal fine si è proceduto all'ispezione presso i luoghi di produzione di 4 ditte ubicate sul territorio della Provincia autonoma di Bolzano, per verificare la conformità dei loro prodotti alle indicazioni del Regolamento 648/2004/CE, del D.Lgs. n. 21/2009, del REACH (Reg. 1907/2006/CE). Durante l'ispezione, eseguita dai Servizi di igiene e salute pubblica dei Comprensori sanitari competenti per territorio, sono stati richiesti dati, documenti inerenti l'autorizzazione sanitaria, le schede tecniche e di sicurezza, sono stati inoltre prelevati tre campioni di detersivi, in ottemperanza alle disposizioni degli art. 28 e 29 del D.Lgs. n. 52/1997 e del D.P.R. 250/1989. Per ciascun campione è stata fatta sia una verifica di conformità dell'etichettatura e delle schede tecniche, sia una verifica analitica inerente il tenore di fosforo, la biodegradabilità dei tensioattivi e la ecotossicità dell'intero formulato.

## Materiali e metodi

Durante l'ispezione presso ciascuna delle 4 ditte produttrici controllate, sono stati prelevati massimo 3 campioni di prodotti detergenti seguendo le disposizioni del D.P.R. 250/1989. I campioni sigillati ed etichettati sono stati immediatamente inviati al Laboratorio biologico provinciale per l'esecuzione delle analisi di biodegradabilità, dei fosfati ed ecotossicologiche. In particolare le analisi di biodegradabilità sono state commissionate ad una ditta esterna, che lavora in certificazione BPL, mentre le analisi dei fosfati sono state svolte dal Laboratorio provinciale analisi acqua e quelle ecotossicologiche dal Laboratorio biologico provinciale.

Nella scelta dei campioni di detergenti prelevati si è cercato di individuare i prodotti maggiormente commercializzati e rappresentativi delle diverse categorie di detersivi (Tab.1).

Tabella 1.

Codice campione	Tipologia di detergente
Labbio/01/2009	Detersivo per pavimenti
Labbio/02/2009	Sgrassatore
Labbio/03/2009	Detersivo per lavatrice
Labbio/04/2009	Detersivo per lavatrice
Labbio/05/2009	Detersivo universale
Labbio/06/2009	Detersivo lavapiatti
Labbio/07/2009	Detersivo universale
Labbio/08/2009	Detersivo per lavastoviglie
Labbio/09/2009	Detersivo per lavatrice
Labbio/10/2009	Detersivo lavapiatti
Labbio/11/2009	Ammorbidente
Labbio/12/2009	Detersivo universale

Per quanto riguarda la biodegradabilità, le analisi sono state eseguite in ottemperanza a quanto stabilito dal Regolamento CE 648/2004, allo scopo di verificare che i detergenti immessi sul mercato soddisfacessero i criteri di biodegradabilità aerobica completa stabiliti nell'Allegato III, che prevede un valore minimo del 60%. La metodica seguita per la determinazione della biodegradabilità completa è la OECD 301B (Sturm test modificato). Per la separazione dei tensioattivi dal formulato completo è stata eseguita un'estrazione su resina, seguita da una verifica mediante HPLC. Per la determinazione della biodegradabilità primaria è stata seguita invece la procedura della prova di conferma del metodo OCSE (OECD 303 A), descritta nell'allegato VIII del Regolamento CE 648/2004, che si basa sull'impiego di un piccolo impianto di depurazione a fanghi attivi.

Per quanto riguarda la determinazione analitica del contenuto di fosforo % è stata seguita la metodica ufficiale indicata nel Decreto del Ministero della Sanità 12 febbraio 1996, ed il risultato è stato confermato anche mediante analisi con ICP-OES, previa mineralizzazione. I limiti di concentrazione, a seconda della tipologia del prodotto, sono indicati nell'art. 5 del D.P.R 21/2009.

Per quanto riguarda invece le analisi ecotossicologiche è stato eseguito il test di tossicità acuta a 48h con il cladocero *Daphnia magna* con stima della EC50 secondo la norma UNI EN ISO 6341, 1999. Il prodotto tal quale è stato opportunamente diluito mediante diluizioni geometriche. Per la preparazione delle varie soluzioni da testare è stata utilizzata acqua di diluizione preparata come previsto dalla metodica UNI EN ISO 6341, 1999. Al termine delle 48h si è calcolata l'immobilizzazione di *Daphnia magna* corrispondente a ciascuna concentrazione e si è proceduto alla

determinazione della EC50-48h, ovvero della concentrazione che in 48 h immobilizza il 50% delle *Daphnia magna* esposte, mediante un idoneo metodo statistico (PASW Statistics 17 – Probit Analysis).

I valori così ottenuti sono stati confrontati con i valori riportati nell'Allegato I, Capitolo 5.2 del D.lgs. 145/2008 al fine di verificare se in etichetta fosse riportata o meno la corretta classificazione di pericolo per l'ambiente, contrassegnata con il simbolo "N" e le frasi di rischio da R50 a R53 (Tabella 2).

*Tabella.2*

Classificazione	Limite EC50 <i>Daphnia magna</i> 48h	
R50 e R53	≤ 1mg/l e - la sostanza non è facilmente degradabile	Altamente tossico per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico
R50	≤ 1mg/l	Altamente tossico per gli organismi acquatici
R-51 e R-53	1mg/l < EC50 ≤ 10 mg/l e - la sostanza non è facilmente degradabile	Tossico per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico
R-52 e R-53	10mg/l < EC50 ≤ 100 mg/l e - la sostanza non è facilmente degradabile	Nocivo per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico

Contestualmente al prelievo dei campioni sono stati effettuati controlli sanitari e la verifica dell'osservanza delle disposizioni in materia di etichettatura e redazione delle schede tecniche, controllando in particolare quanto stabilito dall'art. 11 e dall'Allegato VII del Regolamento CE n. 648/2004, successivamente modificato dal Regolamento CE n. 907/2006, che prevedono che le etichette riportino precise indicazioni sul contenuto e informazioni sul dosaggio.

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

I risultati delle analisi della biodegradabilità sono riportati nella tabella 3. Le soluzioni di tensioattivi da sottoporre a prova sono state confrontate con il sodio benzoato (CAS 532-32-1) come sostanza di riferimento e sono state preparate, secondo le indicazioni del metodo, ad una concentrazione di carbonio compresa fra i 10 ed i 20 mg/l.

Per la maggior parte dei campioni è stata riscontrata una biodegradabilità completa, sia della frazione anionica che non ionica dei tensioattivi, superiore al limite del 60%.

Nel campione Labbio/08/2009 le frazioni non ioniche e anioniche estratte non contenevano sostanze identificabili come tensioattive, mentre il detersivo indicato con il codice Labbio/11/2009, essendo un ammorbidente, conteneva esclusivamente tensioattivi cationici, non sottoponibili al test di degradazione secondo il metodo indicato dal Regolamento CE 648/2004.

Per i campioni Labbio/07/2009, Labbio/10/2009 e Labbio/12/2009 la frazione anionica non ha superato il limite minimo del 60% di biodegradabilità, anche se dall'andamento crescente dei valori parziali di degradazione si è denotato comunque che le sostanze in esame erano biodegradabili e non tossiche per i fanghi di degradazione. Per questi 3 campioni è stato quindi necessario verificare la biodegradabilità primaria con il metodo di conferma. Come si evince dalla tabella n.3, i tensioattivi anionici estratti hanno mostrato risultati decisamente superiori al livello

minimo dell'80% individuato per soddisfare il principio di conformità con le caratteristiche di biodegradabilità dei tensioattivi richieste dalla normativa. I produttori dei detersivi contenenti questa tipologia di tensioattivi anionici avrebbero dovuto richiedere una deroga in base al Regolamento CE 648/2004.

Tabella.3

Codice campione	Risultato % biodegradazione completa Tensioattivi non ionici	Risultato % biodegradazione completa Tensioattivi anionici	Limite % biodegradazione completa	Risultato % biodegradazione primaria Tensioattivi anionici	Limite % biodegradazione primaria
Labbio/01/2009	85,43	92,74	60		
Labbio/02/2009	85,90	84,50	60		
Labbio/03/2009	94,61	69,43	60		
Labbio/04/2009	71,41	62,68	60		
Labbio/05/2009	63,92	78,74	60		
Labbio/06/2009	90,44	81,64	60		
Labbio/07/2009	assenti	51,86	60	92	80
Labbio/08/2009	assenti	assenti	60		
Labbio/09/2009	76,98	62,84	60		
Labbio/10/2009	75,54	27,27	60	95	80
Labbio/11/2009	assenti	assenti	60		
Labbio/12/2009	81,49	43,48	60	96	80

I risultati dell'analisi del fosforo sono indicati nella tabella 4 ed evidenziano che la percentuale di fosforo risulta essere entro i limiti di legge per tutti i campioni analizzati.

I risultati dei test ecotossicologici sono riportati nella tabella 5. Per la valutazione della tossicità si è fatto riferimento all'Allegato I, Cap. 5.2. del D.Lgs. 145/2008, da cui si evince che i campioni con i codici Labbio/01/2009, Labbio/03/2009, Labbio/04/2009, Labbio/09/2009, sono "altamente tossico" il primo e "nocivi per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico" gli altri e andrebbero classificati come pericolosi per l'ambiente, quindi contrassegnati con il simbolo "N" e con le frasi di rischio R50 - R53 nel primo caso, e R52 - R53 negli altri campioni (vedi tabella n. 2). Essendo però facilmente degradabili allora è stata interpretata come non necessaria tale classificazione, come indicato nel Decreto legislativo prima menzionato.



Tabella.4

Codice campione	Risultato P% (peso/peso)	Limite P% (peso/peso)
Labbio/01/2009	<0,05	0,5
Labbio/02/2009	0,05	0,5
Labbio/03/2009	<0,05	1
Labbio/04/2009	<0,05	1
Labbio/05/2009	<0,05	0,5
Labbio/06/2009	<0,05	1
Labbio/07/2009	0,3	0,5
Labbio/08/2009	3,0	6
Labbio/09/2009	0,1	1
Labbio/10/2009	<0,05	1
Labbio/11/2009	0,05	0,5
Labbio/12/2009	<0,05	0,5

Il campione Labbio/08/2009 è tossico e andrebbe classificato come "N" e R51 - R53. Il prodotto però non contiene tensioattivi e quindi non è stato sottoposto alla prova di biodegradabilità. Nella scheda di sicurezza è presente la classificazione N-R50, più restrittiva.

I campioni Labbio/10/2009 e Labbio/12/2009 sono nocivi per gli organismi acquatici e andrebbero classificati come "N" e R52 - R53. Tramite le analisi di biodegradabilità completa, che questi campioni non hanno pienamente superato, è stato però evidenziato un andamento crescente dei valori parziali di degradazione, che denotano che le sostanze in esame sono biodegradabili e non tossiche per i fanghi di degradazione. Inoltre i due formulati hanno superato la prova di biodegradazione primaria, e quindi ai fini della classificazione di pericolo per l'ambiente possono essere comunque considerate facilmente degradabili, come indicato nell'Allegato I Cap. 5.2.1.3 del D. Lgs. 145/2008.

Tabella.5

Codice campione	EC50 a 24 h (mg/l del prodotto tal quale)	Limiti fiduciali al 95% [ mg/l]
Labbio/01/2009	0,887	0,59 - 3,664
Labbio/02/2009	424,2	-3,6 - 488,2
Labbio/03/2009	29,44	21,57 - 80,88
Labbio/04/2009	30	23 - 38
Labbio/05/2009	346,8	255,0 - 428,4
Labbio/06/2009	409,5	94,5 - 4074
Labbio/07/2009	145,6	135,2 - 166,4
Labbio/08/2009	4,7	0,0 - 21,3
Labbio/09/2009	42	34 - 53
Labbio/10/2009	70	60 - 90
Labbio/11/2009	160	110 - 680
Labbio/12/2009	80	50 - 210

Per quanto riguarda infine il controllo delle etichette, 4 prodotti sono risultati non conformi, in particolare per quanto riguarda la mancata indicazione del nr. di carichi standard, della composizione del preparato, incompletezza delle informazioni generiche sull'indirizzo del produttore e in un caso compariva una rappresentazione grafica di frutta che avrebbe potuto indurre in errore l'utilizzatore e quindi, in quanto tale, proibita dall'art. 11, comma 6 del Reg. CE 648/2004. In un caso inoltre non è stata resa disponibile la scheda tecnica, che in base al D.P.R. n. 21/2009, all'art. 3 e 4, deve essere anche notificata all'Istituto superiore di Sanità, che acquisisce i dati relativi ai detergenti, applicando le disposizioni dell'art. 15 del D.Lgs. n. 65/2003, come se si trattasse di preparati pericolosi.

### ***Conclusioni***

Le analisi ecotossicologiche e del contenuto in fosforo hanno dimostrato per tutti i campioni esaminati la conformità di questi parametri ai limiti di legge. Per quanto riguarda invece l'analisi della biodegradabilità completa, per tre detergenti è stata rilevata una non conformità. Per questi tre campioni è stato quindi necessario verificare la biodegradabilità primaria con il metodo di conferma, risultata poi conforme. Questo andamento è tipico dei tensioattivi come gli alchil benzen solfonati lineari (LAS), che presentano un lungo periodo di latenza iniziale nel processo di degradazione e faticano ad essere biodegradati completamente, ma essendo però dei buoni emulsionanti ed avendo soprattutto un basso costo, vengono purtroppo ancora ampiamente impiegati. I produttori avrebbero dovuto comunque richiedere una deroga in base al Regolamento CE 648/2004 e per questo sono stati redatti dei verbali di contestazione. Due ditte sono state inoltre sanzionate per aver commercializzato prodotti con etichette non conformi alla normativa.

Per quanto riguarda le analisi ecotossicologiche, esse risultano fondamentali per la classificazione, in base agli effetti sull'ambiente acquatico, delle sostanze e preparati pericolosi. L'obiettivo principale di questa classificazione è di sensibilizzare l'utilizzatore sui pericoli che tali sostanze e preparati presentano per gli ecosistemi in particolare per quelli acquatici.

Il lavoro svolto ha dimostrato che i controlli di conformità dei prodotti detergenti alla normativa vigente sono di fondamentale importanza per evitare frodi e mancate dichiarazioni in etichetta che si ripercuotono sia sulla salute degli utenti che sulla tutela del nostro ambiente. Questo tipo di controllo è stato eseguito solamente a livello locale nella Provincia autonoma di Bolzano e come progetto pilota, ma sarebbe opportuno fosse esteso di routine a livello nazionale. È stato possibile mettere in evidenza che, nonostante le numerose norme comunitarie e nazionali, presso i produttori vige ancora confusione in materia di etichettatura e di corretta redazione delle schede tecniche e di sicurezza. L'uso inoltre di tensioattivi di vecchia generazione a basso costo ha spesso la prevalenza sull'impiego di tensioattivi ad esempio di origine vegetale con biodegradabilità decisamente superiori.

### ***Bibliografia***

Dlgs. 3 febbraio 1997, n. 52

Dlgs. 14 marzo 2003, n. 65

Dlgs. 28 luglio 2008, n. 145

Decreto del Ministero della Sanità 12 febbraio 1996

D.P.R. 6 febbraio 2009, n. 21

D.P.R. 5 aprile 1989, n. 250

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (1992). Ready Biodegradability 301 B.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (2001). 303 A: Activated Sludge Units

UNI EN ISO 6341 (1999). Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea). Prova di tossicità acuta: 14 pp.

Regolamento (CE) N. 648/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 31 marzo 2004 relativo ai detergenti

Regolamento (CE) n. 907/2006 della Commissione, del 20 giugno 2006 che modifica il regolamento (CE) n. 648/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo ai detergenti ai fini di un adeguamento degli allegati III e VII

Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (Reach), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE della Commissione

# PROTOCOLLO SPERIMENTALE PER IL CONTROLLO DELLA COMPATIBILITA' AMBIENTALE DI MATERIALI INNOVATIVI

*di P. Frisenda \*, M. Francese*

Shoreline Società Cooperativa, Area Science Park, Padriciano 99, Trieste, Italia -  
paolafrisenda@gmail.com, marco.francese@shoreline.it

---

**Abstract** -. In questo lavoro è stato sviluppato un protocollo di estrazione semplificato con due scenari (test in immersione e test pioggia) e due matrici di esposizione (acqua dolce e acqua marina) predisponendo metodi combinati di esposizione/rilascio forzati. Lo scopo principale era quello di diminuire i tempi di estrazione ed arrivare ad una categorizzazione dei materiali sottoposti a prova attraverso l'approccio ecotossicologico classico a prescindere dalle conoscenze dei singoli composti chimici. Procedendo parallelamente tra le sperimentazioni metodologiche e la selezione dei materiali più usati o quelli dimostratisi più "eco" si è potuto pervenire ad un core set di analisi cui sottoporre materiali/vernici ecocompatibili presumibilmente privi di rilascio di sostanze tossiche o biocide.

Parole chiave: detersivi, test ecotossicologici, biodegradabilità, fosforo.

## *Introduzione*

In ambito turistico e naturalistico sono sempre più richieste soluzioni innovative ed ambientalmente sostenibili in particolare nelle strutture ricettive. Per migliorare i servizi offerti, questi settori puntano su una più attenta scelta dei materiali per la realizzazione e la finitura di manufatti e di installazioni dedicate all'accoglienza ed alla divulgazione, specialmente nelle aree sensibili o poste sotto tutela (AMP, SIC, ZPS). Sia per le costruzioni indoor (musei, centri visite, acquari, diorami) che all'aperto (sentieri, installazioni subacquee, protezioni) risulta, perciò, di fondamentale importanza, oltre alla classificazione di "ecologico" o "ecocompatibile" secondo il "Life Cycle Assessment" o il più recente "Environmental Product Declaration", poter disporre anche di maggiori informazioni sull'effettiva atossicità per l'ambiente dei prodotti utilizzati, siano essi di nuova o vecchia generazione. Le principali criticità evidenziate da alcuni Autori fanno riferimento al numero troppo elevato di sistemi di estrazione di sostanze idrosolubili e non (Hesbach e Lamey, 2001), ai tentativi di mimare le diverse condizioni ambientali, ma soprattutto all'estrema variabilità dei risultati ottenuti su uno stesso prodotto o sostanza al variare del protocollo utilizzato (Townsend, et al., 2003), anche conoscendo a priori la natura e l'eventuale pericolosità delle sostanze che possono essere rilasciate nel mezzo liquido (Esser et al., 2002; van der Sloot e Kosson, 2003; van der Sloot e Dijkstra, 2004). In questo lavoro si è scelto perciò di sviluppare un protocollo semplificato con due scenari (test in immersione e test pioggia) e due matrici di esposizione (acqua dolce e acqua marina) predisponendo metodi combinati di esposizione/rilascio forzati, al fine di diminuire i tempi di estrazione e di riuscire così a discriminare anche le eventuali risposte di materiali/vernici ecocompatibili presumibilmente privi di rilascio di sostanze tossiche o biocide.

## Materiali e metodi

Per la messa a punto del protocollo sono state realizzate due vasche sperimentali utilizzando per le parti sommerse materiali inerti quali vetro, silicone per acquari e acciaio inossidabile. La vasca dedicata al test in immersione ha forma cubica (lato di 30 cm) ed è provvista di asta porta campione e coperchio in plexiglass, con valvola e guarnizioni per il mantenimento del vuoto. La vasca allestita per il test pioggia (simulazione condizioni ambientali di esposizione ad agente atmosferico) si sviluppa in senso orizzontale (dimensioni 75x20x20 cm) ed è provvista di pompa ad immersione, a circuito continuo, con ugello microforato e copertura in plexiglass. Tutti gli strumenti prima di ogni sperimentazione sono stati lavati e lasciati in immersione in acqua dolce per 7 giorni. Per entrambi gli scenari il protocollo di lisciviazione è caratterizzato da un tempo di estrazione di 72h a temperatura ambiente ( $20\pm 5^\circ\text{C}$ ) e senza rinnovo di soluzione liscivante. Il rapporto tra il volume e l'area del provino era pari a 0,83 (UNI 10802/Tabella A1), mentre il rapporto tra la soluzione liscivante e l'area esposta era pari a 20 (ASTM D3987-85). Per mantenere costanti tali proporzioni sono stati preparati appositamente provini di forma cubica (lato 5 cm) rappresentativi del prodotto finito, rispettando rigorosamente i tempi di asciugatura delle varie fasi di preparazione, dal supporto alla eventuale sovrapposizione degli strati di resina e/o vernici. Per i campioni provenienti da laboratori/aziende esterne in cui non è stato possibile rispettare le dimensioni si è proceduto alla misura della superficie totale esposta con ricalibrazione del volume di soluzione liscivante. La soluzione liscivante era costituita da acqua marina standard (ISO 10253:2006) e acqua dolce standard (EPA 1978, 1985). Tutti i lisciviati sono stati filtrati su filtri Millipore  $0,45\ \mu\text{m}$  e mantenuti a  $4^\circ\text{C}$  per un massimo di 7 giorni.

È stata condotta una dettagliata attività di ricognizione, di relazione e di selezione sia affrontando il vasto panorama delle aziende produttrici sia utilizzando esperti già operativi nei settori di nicchia della gestione ambientale o degli allestimenti. Un database preliminare ha permesso di selezionare una rosa di materiali rappresentativi per diverse applicazioni escludendo a priori quelli certamente inerti o sicuramente molto tossici. Sulla base di prove preliminari (dati non riportati) in cui sono stati utilizzati diversi saggi biologici per acqua marina (*Artemia franciscana*, *Brachionus plicatilis*, *Vibrio fischeri*, *Phaeodactylum tricorutum*) e acqua dolce (*Daphnia magna*, *Brachionus calyciflorus*, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*) sono stati selezionati, in quanto maggiormente discriminatori, il test sub-cronico di inibizione del tasso di crescita a 72h con *P. tricorutum* e *P. subcapitata* (test A) e il test acuto di mortalità a 48h con *A. franciscana* e *D. magna* (test B). Prima dell'esecuzione dei saggi si è provveduto a correggere il pH, con soluzioni di HCl o NaOH 1M, solo per i lisciviati che si discostavano in modo significativo dall'intervallo di sopravvivenza degli organismi utilizzati. Le specifiche dei materiali sottoposti ai test, la presenza di MSDS con i relativi dati di tossicità (tox) ed ecotossicità (ecotox) ed il metodo di estrazione utilizzato sono elencati nella tabella 1. Sulla base dei risultati dei saggi biologici è stato quindi espresso un giudizio sintetico, così formulato: giudizio "positivo" (🟢) in assenza di tossicità (effetto < 20%) sia nel test A che nel test B; giudizio "negativo" (🔴) se vi era segnale di tossicità (effetto  $\geq 20\%$ ) in entrambi i test; giudizio "potenziale" (🟡) in presenza di tossicità in almeno uno dei due test.

Tabella 1. Elenco e caratteristiche dei materiali selezionati, divisi per macrocategorie, con specifiche d'utilizzo e scenario di esposizione applicato: P-D: test pioggia-acqua dolce; I-M: test immersione acqua marina; I-D: test immersione acqua dolce. Tox: tossico per l'uomo; Ecotox: tossico per gli organismi acquatici; "?" assenza di dati.

Macrocategorie	Codice	Tipi di materiale	MSDS		Utilizzo principale	Metodo
			tox	ecotox		
Impregnanti per legno	LE 01	legno di abete impregnante sintetico	-	-	balaustre/ panchine	P-D
	LE 02	legno di abete impregnante acrilico	-	-	diorama	P-D
Gomme siliconiche e PVC	GOM 01	gomma siliconica A catalizzatore in pasta	no si	no si	organismi acquatici e terrestri	I-M
	GOM 02	gomma siliconica B catalizzatore B agente tixotropico	no si no	no si no	calco su superfici esterne	P-D
	GOM 03	gomma siliconica B catalizzatore B	no si	no si	calco su superfici esterne	
	GOM 04	silicone per acquari	no	no	vasche e allestimenti	I-M
	GOM 05	PVC plastificato tessuto in poliestere	no no	no no	impermeabilizzazioni piscine	I-D
Impregnanti per terreni	TER 01	terra impregnante acrilico A	-	-	sentieri/ piste ciclabili	P-D
	TER 02	terra e vegetazione impregnante acrilico B	- ?	- ?	diorama	P-D
Resine e polimerici	RES 01	resina epossidica	si	?	acqua/ ghiaccio costruzioni trasparenti	I-D
	RES 02	resina poliestere	-	-	modelli, scafi, roccia finta	I-M
	RES 03	mastice per marmisti	si	?	modelli per esterni	P-D

	RES 04	poliuretano espanso, resina poliestere, pittura murale per esterni, pittura acrilica trasparente	-	-	prototipo scultura	P-D
	RES 05	resina fenolica di origine vegetale resina epossidica	- SI	? SI	modelli, scafi, roccia finta	I-M
	RES 06	polipropilene , polietilene sansa esausta	-	-	pontili, passerelle marine	I-M
	RES 07	polipropilene fibre di legno duro	-	-	pontili, passerelle marine	I-M
<b>Materiali vari</b>	MAL 01	malta naturale	-	-	eco-intonaco termico	P-D

## Risultati

Per alcuni materiali il processo di estrazione, già dopo alcune ore, ha portato ad evidenti modificazioni della soluzione lisciviata con formazione di schiuma superficiale densa in LE 02, GOM 02, GOM 03 e TER 01, di depositi mucosi in LE 02 e TER 01 e di liquido dall'aspetto opalescente in GOM 02 e GOM 03 (Tab. 2). Tali alterazioni sono state totalmente eliminate attraverso la successiva filtrazione. Nei lisciviati dei materiali LE 01, LE 02, GOM 03, GOM 04 è stata osservata una decisa diminuzione nei valori di pH (7.10, 6.72, 5.83 e 4.55 rispettivamente), mentre per MAL 01 il pH finale era aumentato fino a 11.86.

Come si può notare nella tabella 2, in base ai risultati dei saggi biologici è stato espresso un giudizio sintetico "positivo" per i materiali GOM 04, GOM 05, TER 02, RES 01, RES 06 e RES 07, "negativo" per i materiali LE 02, GOM 03, RES 03, MAL 01 ed infine "potenziale" per LE 01, GOM 01, GOM 02, TER 01, RES 02, RES 05.

*Tabella 2. Schema riassuntivo dei risultati ottenuti e relativo giudizio sintetico. Test A: percentuale di variazione del tasso di crescita nei saggi sub-cronici con alghe. Test B: percentuale di mortalità nei saggi acuti con crostacei. In verde i materiali classificati come eco-compatibili e/o eco-friendly.*

Codice	Test A	Test B	Giudizio	Osservazioni
LE 01	-88	0	☹️	Correzione pH
LE 02	-51	20	🔴	Deposito mucoso e schiuma. Correzione pH
GOM 01	-147	3.3	☹️	-
GOM 02	-95	0	☹️	Opalescente. Schiuma.
GOM 03	-105	100	🔴	Opalescente. Schiuma. Correzione pH
GOM 04	-10	0	🟢	Correzione pH
GOM 05	-11	0	🟢	-
TER 01	-97	0	☹️	Saponoso al tatto. Deposito mucoso e schiuma
TER 02	-6	0	🟢	
RES 01	-5	0	🟢	60% organismi intrappolati dalla tensione
RES 02	-30	0	☹️	-
RES 03	-32	80	🔴	-
RES 04	-44	0	☹️	-
RES 05	-100	0	☹️	-
RES 06	-3	3.3	🟢	-
RES 07	6	0	🟢	-
MAL 01	-95	100	🔴	Correzione pH

## Discussione

Si premette che questo lavoro sperimentale aveva come scopo proprio quello di verificare la validità del metodo di estrazione per arrivare ad una categorizzazione dei materiali sottoposti a prova attraverso l'approccio ecotossicologico classico a prescindere dalle conoscenze dei singoli composti chimici.

Per tutti i materiali il cui giudizio e risultato "negativo" o "potenziale", i forti decrementi del tasso di crescita algale, nella maggioranza dei casi prossimi o superiori al 50%, confermerebbero che il processo di lisciviazione applicato è sufficiente ad estrarre componenti tossiche e probabilmente idrosolubili dai prodotti finiti.



Nelle gomme siliconiche (GOM 01, GOM 02, GOM 03), ad esempio, tali risposte potrebbero indicare un probabile rilascio di catalizzatore non coinvolto nel processo di polimerizzazione o rimasto in eccesso sulla superficie del provino, passando quindi facilmente nella fase liquida. A conferma di quanto ipotizzato, dalle schede tecniche risulta che tra i componenti principali sono presenti miscele non tossiche, mentre risulta tossico per l'ambiente acquatico solo il catalizzatore che porterebbe sia effetti acuti (mortalità del 100% in GOM 03) sia effetti sub cronici (da 95 a 147% di inibizione del tasso di crescita algale rispetto ai controlli). Considerazioni simili possono essere fatte anche per i materiali RES 03 e RES 04 anche se non sono disponibili dati di ecotossicità pregressi.

Per i prodotti ecocompatibili RES 05 e MAL 01, invece, è interessante notare che i risultati ottenuti non indicano affatto una completa atossicità per l'ambiente. In particolare, RES 05 pur classificato come prodotto ecocompatibile in quanto costituito per il 60% da prodotti di derivazione naturale, mostra decisi effetti sub cronici con una forte inibizione del tasso di crescita algale (-100% rispetto ai controlli). Anche in questo caso l'analisi preliminare del composto evidenzia la presenza di una certa percentuale di resina epossidica liquida modificata che induce moderati effetti di tossicità e un moderato potenziale di bioconcentrazione. In MAL 01, composto totalmente naturale e privo di qualsiasi sostanza chimica, è probabile che il forte effetto caustico della calce si manifesti anche in seguito al contatto con l'acqua del prodotto solidificato ed alla correzione del pH prima dell'esecuzione dei saggi biologici.

L'assenza di tossicità per GOM 04, GOM 05, TER 02, RES 01, RES 06 e RES 07 e in accordo con quanto dichiarato nelle MSDS.

### *Conclusioni*

I risultati ottenuti hanno permesso di distinguere in modo piuttosto netto gli effetti sull'ambiente dei lisciviati di materiali anche estremamente diversi, in accordo nella maggioranza dei casi con le dichiarazioni contenute nelle MSDS. Dal punto di vista tecnico, gli obiettivi raggiunti in questo lavoro rappresentano un avanzamento operativo importante in quanto tutti gli strumenti utilizzati potranno essere facilmente applicati ad altre tipologie di materiali, ecocompatibili e non. Nello specifico la conformazione delle vasche e dei supporti permette l'alloggiamento di campioni di diverse dimensioni senza compromettere la comparabilità delle risposte dei saggi ecotossicologici. Inoltre, la riduzione dei tempi di estrazione dei lisciviati, dei volumi utilizzati e la possibilità di utilizzare diversi strumenti di agitazione, consente di operare contemporaneamente su più scenari espositivi.

Procedendo parallelamente tra le sperimentazioni metodologiche e la selezione dei materiali più usati o quelli dimostratisi più "eco" si è dunque potuto pervenire ad un core set di analisi cui sottoporre in futuro i materiali definiti a basso impatto ambientale, producendo una serie di risultati utili alla catalogazione.

### *Bibliografia*

ASTM D3987-85 (2004) Standard Test Method for Shake Extraction of Solid Waste with Water.

Esser P.M., H. A. van der Sloot, W.L.D. Suitela (2002) Harmonization of leaching tests: leaching behaviour of wood. HERON Vol. 46, no. 4: 15-29.

Hesbach P., S. Lamey (2001) U.S. Department of Energy Technology Laboratory, personal communication.

ISO 10253:2006 Qualità dell'acqua - Saggio di inibizione della crescita di alghe marine con *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornutum*.

Townsend T., Y-C Jang, T. Tolaymat (2003) A Guide to the Use of Leaching Tests in Solid Waste Management Decision Making. Department of Environmental Engineering Sciences University of Florida. Report 03-01(A): 1-31.

UNI 10802:2004 Rifiuti - Rifiuti liquidi, granulari, pastosi e fanghi - Campionamento manuale e preparazione ed analisi degli eluati. Tabella A1.

USEPA 1978a The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test. Miller, W.E., J.C. Greene., and T. Shiroyama (eds.). Environmental Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR 97333. EPA-600/9-78-018.

van der Sloot H.A., D.S Kosson (2003) A unified approach for the judgement of environmental properties of construction materials (cement-based, asphaltic, unbound aggregates, soil) in different stages of their life cycle. Proceedings WASCON 2003 Conference, San Sebastian, Spain.

van der Sloot H.A., J.J. Dijkstra (2004). Development of horizontally standardized leaching tests for construction materials: a material based or release based approach? Identical leaching mechanisms for different materials. ECN report: ECN-C-04-060: 1-56.

# VALUTAZIONE DELLA ECOTOSSICITÀ DEI RIFIUTI: IMPLEMENTAZIONE DELL'APPROCCIO DI BASE UTILIZZANDO UNA BATTERIA DI SAGGI DI TOSSICITÀ ACUTA, CRONICA E DI MUTAGENICITÀ

*di T. Leoni\*, L. Liuti, S. Sarcina, A. Valenti*

ARPAM Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche, Macerata, Italia - tristiano.leoni@ambiente.marche.it

---

**Abstract** - E' stata applicata su alcune tipologie di rifiuti una batteria di test ecotossicologici con l'obiettivo di ampliare gli strumenti di valutazione aggiungendo end-point di tipo cronico e genotossico rispetto a quanto previsto dalla norma attualmente in vigore. L'approccio utilizzato ha dimostrato che gli end-point aggiuntivi possono evidenziare risposte positive altrimenti non rilevabili. La presente esperienza può essere anche intesa come proposta volta ad eliminare l'utilizzo dei vertebrati acquatici, indicati tra gli organismi da utilizzare obbligatoriamente, ma nello stesso tempo soggetti a future restrizioni in base al regolamento REACH

Parole chiave: H14, tossicità acquatica, Ames, ostracode, CLP

## *Introduzione*

Le attuali norme di riferimento per la definizione del criterio H14 prevedono l'effettuazione di tre test acuti rappresentativi della catena trofica acquatica, utilizzando gli organismi di cui al regolamento CE 440/2008 - Allegato C - Metodi C1 (pesci), C2 (crostacei), C3 (alghe).

Questi test, rappresentando tre distinti livelli trofici, restituiscono generalmente risposte complementari anche se i test acuti con pesci e daphnia possono rispondere in buona sostanza alla stessa tipologia di stressori (Guzzella L., Marchetti R. 1992), restringendo così probabilmente l'ampiezza di risposta della batteria.

Inoltre, da pregresse esperienze pratiche, è stato verificato che per varie matrici ambientali, si è dimostrato discriminante il risultato di saggi cronici condotti con crostacei (Leoni T., Sarcina S., Valenti A. 2007), come pure l'utilizzo del test di mutagenicità con batteri.

Sulla base di queste osservazioni è stata quindi allestita una batteria costituita da quattro saggi aventi differenti end-point con la quale sono state testate quattro tipologie di rifiuti: suolo contaminato da idrocarburi policiclici aromatici, cenere proveniente da inceneritore municipale, morchie di verniciatura, rifiuto da trattamento di fumi di fonderia.

## *Materiali e metodi*

I metodi sono riferiti a protocolli standardizzati e prevedono l'utilizzo di quattro specie (alga, due crostacei, un batterio). Due specie sono tra quelle riportate nel regolamento 440/2008/CE, mentre le altre due sono state scelte in quanto già testate con risultati positivi nel nostro laboratorio.

Tali metodi sono riportati nella tabella sottostante.

Per ciascun organismo è stato effettuato un test limite alla concentrazione di 100 mg/l, valutando esclusivamente la eventuale positività a questa unica concentrazione. Considerato che la verifica ha riguardato esclusivamente la tossicità della fase acquosa, da ciascun rifiuto è stato ottenuto il relativo eluato acquoso secondo le modalità riportate nella tabella A.

Tabella A. Metodi ecotossicologici

Specie	Modalità di preparazione dell'eluato	Metodo di prova	End-point
<i>Daphnia magna</i>	100 mg di rifiuto in 1 litro di acqua di diluizione	APAT CNR IRSA Man 29/2003 Met 8020	% immobilizzazione
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	100 mg di rifiuto in 1 litro di soluzione di mantenimento	ISO 8692:2004	% inibizione crescita
<i>Heterocypris incongruens</i>	100 mg di rifiuto in 1 litro di standard freshwater	OSRACODTOXKIT	% mortalità % inibizione accrescimento
<i>Salmonella typhimurium</i>	100 mg di rifiuto in 1 litro di acqua bidistillata	Ames Test - Standard Methods for the examination of water and wastewater 21nd edition 2005 Metodo 8030	Rapporto di mutagenicità (RM)

Tutti i rifiuti si presentavano con una granulometria molto fine per cui non è stato effettuato alcun trattamento meccanico, tranne una fase di omogeneizzazione manuale prima della pesata.

I singoli eluati utilizzati nei rispettivi test limite sono stati preparati secondo la metodica UNI EN 12457-2:2004 nel seguente modo: il rifiuto, dopo la pesata e l'aggiunta dell'eluente, è stato mantenuto in agitazione per 24 ore a 5-10 rpm alla temperatura di  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ; successivamente l'eluato è stato filtrato su membrana di porosità  $0,45\mu$ .

Con gli eluati acquosi sono stati effettuati i singoli saggi secondo la procedura prevista dal rispettivo metodo.

Per quanto riguarda l'ostracode, essendo il test previsto per la fase solida, volendo utilizzare anche in questo caso l'eluato, si è deciso di impiegare il sedimento di riferimento (sabbia) del kit al quale sono stati aggiunti 2 ml di eluato ottenuto dal rifiuto e standard freshwater.

### Risultati

I risultati sono riassunti in tabella B.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con *Daphnia magna* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, è evidente come le positività al test limite siano state tutte molto marcate, e sebbene non si sia proceduto alla successiva valutazione della EC 50 come previsto dal Regolamento 1272/2008/CE, si può ipotizzare, vista l'entità dell'effetto alla concentrazione di 100 mg/l, una EC 50 inferiore a questo valore.

Per quanto riguarda i saggi “aggiuntivi” proposti, si noti come il test di mutagenesi abbia evidenziato positività, utilizzando i criteri previsti dal metodo 8030, Standard Methods for the examination of water and wastewater, 21nd edition 2005, quando gli altri saggi non indicavano segnali di ecotossicità particolari e il saggio con ostracode abbia risposto in maniera consistente con entrambi gli end-point previsti, in particolare nei rifiuti in cui il test acuto con daphnia risultava negativo.

Tabella B. Risultati ottenuti

Tipologia di rifiuto	Test di Ames	Tox acuta <i>Daphnia magna</i>	Test inibizione algale <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Tox cronica <i>Heterocypris incongruens</i>
1- Suolo contaminato da IPA	POSITIVO (RM 1,6)	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2 - Cenere proveniente da inceneritore municipale	NEGATIVO	POSITIVO (75% immobilizz.)	POSITIVO (70% inib. crescita)	NEGATIVO
3 - Morchie di verniciatura	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (74% inib. crescita)	POSITIVO (50% mortalità) (62% riduz. accresc.)
4 - Rifiuto da trattamento fumi di fonderia	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (98% inib. crescita)	POSITIVO (30% mortalità) (45% riduz. accresc.)

### Discussione

Testando con questo set di saggi i quattro rifiuti considerati, è emersa una buona integrazione tra i risultati ottenuti che conferma come l'approccio utilizzato possa permettere di individuare situazioni di ecotossicità altrimenti non evidenziabili.

Pur non essendo stato effettuato in questa fase il saggio acuto con vertebrati acquatici previsto dal regolamento 440/2008/CE, si ritiene che la batteria utilizzata abbia comunque un potere discriminante potenzialmente superiore, viste le analogie di risposta tra pesci e daphnia nei confronti di vari inquinanti, per cui l'utilizzo contemporaneo di queste specie in saggi acuti può determinare la sottostima o la mancata risposta con alcune tipologie di rifiuti.

Per quanto riguarda i rifiuti da noi analizzati si noti come nel campione n°1 l'unica positività manifestatasi sia stata quella relativa alla mutagenicità ed inoltre è da rilevare che questa si è espressa in presenza di attivazione metabolica con il ceppo TA98. La positività rilevata nelle repliche in cui era prevista la fase di attivazione metabolica (+ S9), ha confermato le aspettative essendo il suolo in esame contaminato da una miscela di IPA i quali necessitano in genere di essere metabolizzati ad opera del citocromo P450 per esplicitare la loro attività mutagena.

Anche il saggio cronico con ostracode ha mostrato una buona capacità di evidenziare fenomeni tossici, in particolare quando il saggio acuto con daphnia non faceva emergere fenomeni significativi, indicando ancora una volta (Leoni T., Sarcina S., Valenti A. 2007) che l'inserimento di un saggio cronico con un crostaceo in una

batteria rappresentativa della catena trofica acquatica, può dare garanzie maggiori di protezione ambientale rispetto all'utilizzo di soli saggi acuti.

Il saggio algale inoltre, in questa sperimentazione, ha fornito risultati che evidenziano una eccellente risposta con i rifiuti contaminati prevalentemente da metalli pesanti, ed in particolare il campione n°4, nel quale erano presenti concentrazioni notevoli di cromo, zinco, piombo e nichel, ha evocato una inibizione alla crescita pari al 98% nel test limite a 100 mg/l.

Tra i test utilizzati, quello con daphnia ha fornito in generale risultati spesso negativi, a parte il campione n°2, caratterizzato tra l'altro da una bassa concentrazione di metalli (rame, zinco, nichel) ed una sostanziale assenza dei principali contaminanti organici, ove la percentuale di immobilizzazione è stata consistente ed il dato è stato confermato anche dalla positività del saggio algale, evidenziando, in questo caso, la necessità dell'approccio ecotossicologico mediante l'utilizzo di saggi per valutare adeguatamente la presenza o meno di ecotossicità.

### ***Conclusioni***

Nella valutazione del rischio ecotossico, l'indicazione sui saggi da effettuare sui rifiuti fornita dalla normativa vigente deve essere considerata un passo importante verso una valutazione di grande rilievo ambientale con risvolti notevoli anche sul fronte igienico sanitario.

Si pensi solo in quanto poco tempo si è passati dalla effettuazione dei primi studi e circuiti europei sulla ecotossicità dei rifiuti alla emanazione di una normativa europea che, sebbene ancora incompleta e di non facile applicazione, getta le basi sulla applicazione dei saggi biologici in un importante e delicato ambito.

In confronto, lo sviluppo e applicazione della ecotossicologia nella definizione della qualità ambientale delle acque, perlomeno dal punto di vista normativo, non ha avuto una accelerazione altrettanto rapida.

Quindi quello attuale può essere già considerato un buon obiettivo raggiunto.

Uno degli scopi di questo lavoro, basato anche su pregresse esperienze relative all'utilizzo dei saggi biologici in ambito acquatico, è di aumentare prevedibilmente lo spettro di rilevabilità della ecotossicità utilizzando saggi con organismi differenti, dotati di end-point differenti e differenziati in configurazioni acute e croniche al fine di proporre una integrazione della batteria di base che, limitandosi ad end-point prevalentemente acuti ed utilizzando specie pelagiche (pesci e crostacei), rispondendo verosimilmente alle stesse categorie di inquinanti, può determinare la sottostima della ecotossicità.

E' chiaro che l'approccio proposto ha un costo maggiore, che però si ridimensiona in termini di rapporti costi benefici vista la possibilità di considerare effetti genotossici, utilizzando tra l'altro un saggio che è anche indicato dal regolamento 440 per la valutazione degli effetti tossici sull'uomo ed end-point di tipo cronico, capaci di rispondere a più bassi livelli di contaminazione, che insieme possono permettere di valutare più correttamente questa caratteristica dei rifiuti estremamente importante per la tutela dell'ambiente e della salute.

### ***Bibliografia***

ADR 2011, Accordo europeo relativo al trasporto internazionale delle merci pericolose su strada

Ames Test, Standard Methods for the examination of water and wastewater, 21nd edition 2005, metodo 8030, pp. 30-36

APAT CNR IRSA Man 29/2003, Metodi di valutazione della tossicità con Daphnia, metodo 8020, pp. 993-1001

Guzzella L., Marchetti R. (1992) Il saggio di tossicità della 319/76: pregi, difetti e alternative, *Biologia Ambientale*, vol.5, pp. 4-9

ISO 8692:2004, Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae

Leoni T., Sarcina S., Valenti A. (2007) Valutazione ecotossicologica di sedimenti fluviali. Test cronici vs acuti, *Atti 8° workshop Fitotox*, pp. 9-15

Regolamento Commissione Ce 440/2008/Ce, Metodi di prova ai sensi del regolamento (Ce) n. 1907/2006 "Reach"

Regolamento Parlamento europeo e Consiglio Ue 1272/2008/Ce, Classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele

Persoone G. (2001), Ostracodtoxkit F Chronic direct contact toxicity test for freshwater sediments: standard operational procedure (Belgium)

UNI EN 12457-2:2004, Caratterizzazione di rifiuti - Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e fanghi

## TAVOLA ROTONDA 3: ATTUAZIONE DELLA DIRETTIVA QUADRO RELATIVA ALLA STRATEGIA MARINA (D.LGS 190/2010): QUADRO CONOSCITIVO NAZIONALE E STATO DELL'ARTE.

*di Fulvio Onorati e Cristian Mugnai*

---

In base alle comunicazioni di apertura del Dr. G. Giorgi e della Dr.ssa Maggi è stata messa in evidenza, a fronte di un inquadramento giuridico generale e degli obiettivi con le relative scadenze stabilite dal D.L. 190 che recepisce la Direttiva Quadro sulla Strategia Marina 2008/56/CE (MSFD) la mancanza di un ruolo affidato alle analisi ecotossicologiche mediante saggi biologici. L'attuale conformazione dei Reporting Sheets per mezzo dei quali i dati devono essere inviati alla Commissione Europea non contempla, infatti, l'utilizzo dei saggi biologici per la valutazione degli impatti, in quanto (per definizione) non è possibile associare gli effetti con la pressione (concentrazione di specifici contaminanti in acqua, sedimenti e biota).

Al fine di recuperare il ruolo dei saggi biologici è stato concordato, con il supporto del MATTM, di produrre al più presto una nota ufficiale a nome di tutti gli enti rappresentati nel convegno da indirizzare a quest'ultimo, nel quale oltre a far presente la problematica, si chiede di farsi portavoce in sede comunitaria di individuare un percorso giuridico e tecnico per introdurre il contributo informativo fornito dai saggi biologici.



# IL REPORT SULLA CONTAMINAZIONE DA SOSTANZE PERICOLOSE AI SENSI DELLA DIRETTIVA QUADRO SULLA STRATEGIA MARINA 2008/56/CE

*di G. Giorgi*

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma , Italy -  
sistema152@isprambiente.it

---

La struttura, i concetti base e le definizioni generali del Report sulla Valutazione iniziale, la definizione del Buono Stato Ambientale (GES) e dei Traguardi ambientali ai sensi degli artt. 8, 9 e 10 della Direttiva Quadro sulla Strategia Marina 2008/56/CE (MSFD), viene analizzata con particolare riguardo alla tematica della contaminazione da sostanze pericolose.

Le scale spaziali delle informazioni richieste sono dedotte in base allo schema di suddivisione geografica previsto dal Report: aree di valutazione, sotto regioni e regione del bacino mediterraneo.

Le scale temporali sono confrontate con la periodicità e ciclicità nell'esercizio di reporting.

La definizione del GES viene esposta alla luce della articolazione in descrittori, criteri ed indicatori previsti dalla Decisione della Commissione Europea 477/2010/EU del 1 settembre 2010 nonché le relazioni funzionali tra loro definite in base allo schema concettuale del Report.

La definizione dei valori soglia e delle condizioni di riferimento per gli indici specifici selezionati all'interno della classe degli indicatori ai fini della definizione del GES è visto all'interno del contesto di integrazione spaziale, tra le diverse aree geografiche selezionate per la valutazione iniziale, e funzionale.

Il contesto generale delle informazioni richieste per la definizione dei traguardi ambientali viene analizzato dando particolare rilievo alle aree target per la valutazione del raggiungimento degli obiettivi.

Brevi cenni sono dedicati al report sui programmi di monitoraggio previsto dalla MSFD nel 2014.

# IL RUOLO DELL'ECOTOSSICOLOGIA NELL'AMBITO DEGLI OBIETTIVI DELLA MARINE STRATEGY FRAMEWORK DIRECTIVE

*di C. Maggi\* e F. Onorati*

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma , Italy - chiara.maggi@isprambiente.it

---

Nell'ambito della Strategia Marina (Direttiva 56/2008/EC e D.Lg 190/2010) l'aspetto ecotossicologico è contenuto all'interno del Descrittore 8 :” Contaminazione da sostanze pericolose”. Il Descrittore 8 prevede un'analisi iniziale della pressione “contaminanti” attraverso una quantificazione degli input da fonti puntuali e diffuse (da terra e da atmosfera) e delle concentrazioni in acqua, sedimenti e biota, suddiviso a sua volta in “habitat predominanti” e “gruppi funzionali”; l'analisi delle pressioni viene completata da una valutazione degli impatti, associati alle diverse categorie di contaminanti, su “habitat predominanti” e “gruppi funzionali”, che, di fatto, si identifica con l'analisi del solo aspetto ecotossicologico legato al bioaccumulo-biomarker. Successivamente all'analisi delle pressioni, la Direttiva richiede una valutazione dello “status” per la verifica del “Good Environmental Status” da definire, prima, a livello di singolo indicatore e da integrare, poi, a livello di Descrittore.

Tale impostazione non considera l'aspetto dei saggi biologici ex-situ: essi infatti, al momento, non trovano collocazione nella valutazione degli effetti così come richiesto dalla Direttiva, sia perché non associabili a specifiche categorie di contaminanti, sia perché non direttamente riconducibili ai gruppi funzionali previsti dalla Direttiva stessa (in quanto trattasi di prove di laboratorio ex-situ).

Scopo di questo intervento è quello di trasmettere alla comunità scientifica nazionale i contenuti tecnici della Direttiva Strategia Marina e di accendere la discussione sull'opportunità/necessità di stabilire un percorso tecnico e amministrativo finalizzato a recuperare il potenziale informativo ed il ruolo dei saggi biologici ex-situ nella definizione della qualità ambientale degli ambienti marini nazionali.

## POSTER APPARTENENTI AD “ALTRE TEMATICHE”

*di Cristian Mugnai*

---

Di seguito vengono riportati i contributi relativi a 4 poster non classificabili nelle sessioni A, B e C e nelle tavole rotonde.

Presentano validi casi di studio di applicazioni di metodologie di valutazione ecotossicologica nel campo delle estrazioni petrolifere, nel biorisanamento e sulla valutazione del rischio ecologico di erbicidi antivegetativi in mare.

Viene presentato anche un esperimento per la valutazione degli effetti genotossici del rame su semi di veccia comune (*Vicia sativa L.*).

# VALUTAZIONE ECOTOSSICOLOGICA E APPLICAZIONE DELL'INDICE MACROFITICO IBMR NELL'AREA DI ESTRAZIONE PETROLIFERA DELLA REGIONE BASILICATA

*di M. Casamassima\*, G. Filippo, A. Marraudino, S. Longo, T. Trabace, A. Palma*

Centro di Ricerca Metapontum Agrobios, \*mcasamassima@agrobios.it

---

**Abstract** -. Nell'ambito del Programma Operativo Val d'Agri 2009-2010, finanziato dalla Regione Basilicata e condotto dal Centro di Ricerca Metapontum Agrobios, dal titolo "Studio finalizzato alla valutazione dell'impatto delle attività estrattive della Val D'Agri", è stata eseguita una valutazione ecotossicologica e l'applicazione dell'indice macrofitico IBMR (Macrophyte Biological Index for Rivers) nei fiumi Agri, Camastra, ed i loro principali affluenti. Lo scopo di questo lavoro è quello di confrontare lo studio ecotossicologico su campioni di acqua superficiale e sedimento e l'indice macrofitico IBMR.

Dai risultati ottenuti si evidenzia che i test di tossicità hanno mostrato una diversa sensibilità tra gli organismi testati e soprattutto fra le diverse matrici indagate. I saggi ecotossicologici e l'indice biologico forniscono risposte complementari utili per la valutazione della qualità degli ambienti di acqua dolce e rappresentano quindi degli affidabili metodi di indagine e degli strumenti per il monitoraggio ambientale.

Parole chiave: saggi ecotossicologici, IBMR, monitoraggio ambientale

## *Introduzione*

La Regione Basilicata detiene il primato nazionale del numero di permessi di ricerca e concessioni di coltivazioni di idrocarburi che interessano svariate migliaia di ettari del territorio lucano. In tale contesto il bacino della Val D'Agri e quello dell'area Sauro e Camastra sono quelli maggiormente interessati anche per la presenza del Centro Oli di Viggiano e del costruendo Centro Oli di Corleto Perticara. In questo stesso territorio ricadono risorse idriche significative in termini quali-quantitativi ed un comparto produttivo a prevalente vocazione agricolo-zootecnica, anch'esso di grande pregio. L'acqua da sempre costituisce una delle principali risorse della Val d'Agri. Oltre agli usi potabili, irrigui e ricreativi per le popolazioni residenti, beneficiano dell'acqua della valle anche le province della Basilicata e della Puglia. Le attività petrolifere nell'area in oggetto sono, per i suddetti motivi, certamente tra le attività a maggior rischio ambientale sia nelle fasi di indagine e prospezione che durante l'estrazione, il trasporto ed il trattamento del greggio estratto. Un attento monitoraggio può assicurare la convivenza delle estrazioni con un ambiente in cui si riscontrano non solo valenze ambientali e riserve idriche significative, ma anche la presenza di soggetti esposti alle potenziali sorgenti di contaminazione ambientale presenti nell'area interessata da trenta comuni.

Gli studi finanziati dalla Regione Basilicata in collaborazione con il Centro di Ricerche della Metapontum Agrobios hanno consentito di valutare tali impatti sulle diverse matrici ambientali (acque superficiali, acque sotterranee, sedimenti fluviali, suoli, aria,

vegetali ed alimenti) interessate dall'attività petrolifera. Il Programma Operativo Val d'Agri 2009-2010, dal titolo "Studio finalizzato alla valutazione dell'impatto delle attività estrattive della Val D'Agri", ha consentito la valutazione sistematica dello stato ambientale.

Lo scopo di questo lavoro è quello di confrontare lo studio ecotossicologico e l'indice macrofitico IBMR (Macrophyte Biological Index for Rivers (AFNOR, 2003 e Haury et al., 2006) nei fiumi Agri, Camastra, ed i loro principali affluenti. Un test di tossicità si fonda sul principio secondo il quale, esponendo un organismo vivente ad un agente tossico, la risposta risulta essere funzione diretta della dose assunta e indiretta del livello di esposizione; quindi, in generale essi vengono descritti da relazioni dose-risposta e da curve attività-effetto.

Gli indici basati sull'uso delle macrofite acquatiche danno indicazioni complessive sulla qualità dell'acqua e sul livello di alterazione dei corpi idrici sulla base della composizione dei popolamenti macrofitici presenti, ritenuti importanti per determinare lo "stato ecologico" di fiumi e laghi in Europa (European Parliament, Directive 2000/60/CE).

Le acque e i sedimenti del fiume Agri e suoi affluenti Casale, Alli e del torrente Camastra sono stati sottoposti ad una batteria di test ecotossicologici, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Lepidium sativum*. Nelle stesse stazioni è stato determinato l'indice IBMR.

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

#### *Area di indagine*

Il fiume Agri nasce in località "Piano del lago" 1280 m s.l.m. nel territorio del comune di Marsico Nuovo, ai piedi del Monte Lama. Incassato in valli dal tipico profilo a V nel primo tratto, il fiume scorre per circa 9 km fino all'abitato di Marsico Nuovo. Allo sbocco della valle perde molta della propria energia, depositando gran parte del materiale alluvionale trasportato e si avvia in lieve pendenza fino all'invaso del Pertusillo (785 m s.l.m.). Gli affluenti sono caratterizzati dal regime torrentizio. Il torrente Camastra è un importante affluente del fiume Basento ed è sbarrato dall'omonima diga. In Figura 1 è riportata l'area di studio.

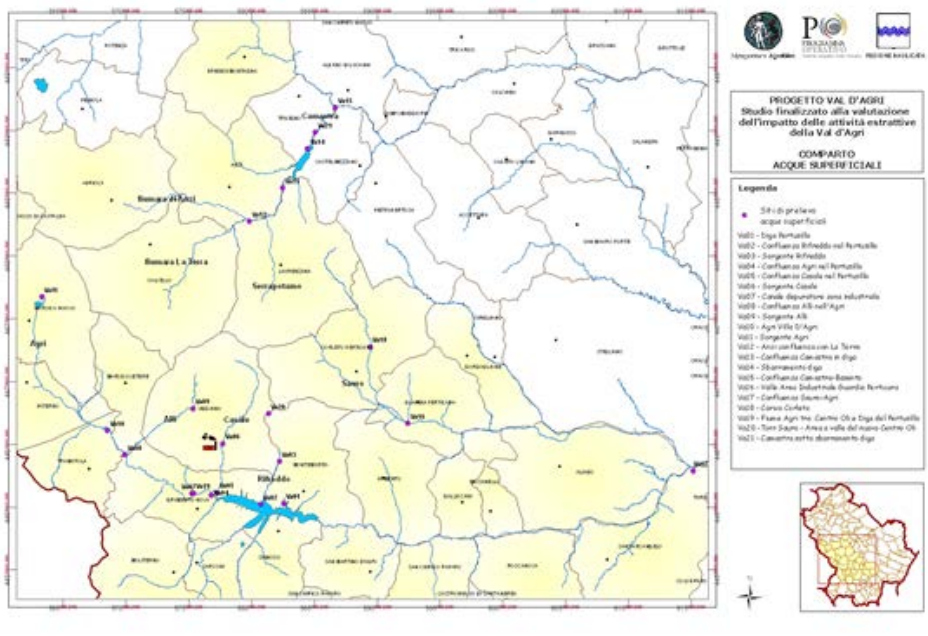


Figura 1. Area di studio

In Tabella sono elencate le stazioni oggetto di studio.

Tabella 1 Stazioni oggetto di indagini

Stazioni di studio	Descrizione sito	Corpo idrico
Va04	Confluenza Agri nel Pertusillo	Fiume Agri
Va05	Confluenza Casale nel Pertusillo	Torrente Casale- affluente fiume Agri
Va08	Confluenza Alli nell'Agri	Fiume Agri- affluente fiume Agri
Va09	Sorgente Alli	Torrente Alli- affluente fiume Agri
Va21	Camastra - sotto sbramento Diga	Torrente Camastra

### Indagini Ecotossicologiche

Per valutare la tossicità dei campioni sono stati utilizzati saggi con batteri bioluminescenti della specie *Vibrio fischeri* ( APAT IRSA-CNR 29/2003 - 8030), saggi con il cladocero *Daphnia magna* a 24h (utilizzando il kit DAPHTOXKIT F™), e il test di fitotossicità a 72 h con semi di *Lepidium sativum* in riferimento al metodo APAT RTI CTN\_TES 1\_2004. L'elutriato dei sedimenti è stato ottenuto seguendo il protocollo APAT, RTI CTN\_TES 1/2004.

### *Indice macrofitico*

Il campionamento delle macrofite acquatiche è stato effettuato secondo il protocollo APAT, 2007; l'indice è stato calcolato secondo Haury et al., 2006. Al fine del suo calcolo, considera 250 taxa indicatori a cui sono associati indici specifici di sensibilità (0-20) e un valore indicatore (1, 2, 3). I 250 taxa sono costituiti da: 43 taxa algali, 2 specie di licheni, 15 specie di epatiche, 37 di muschi e 120 di angiosperme. La formula per calcolare l'indice è la seguente:

$$IBMR = \frac{\sum_i^n [E_i \cdot K_i \cdot C_{s_i}]}{\sum_i^n E_i \cdot K_i}$$

dove

*i* = specie indicatrice;

C<sub>s</sub> = punteggio specifico di oligotrofia della singola specie (1-20)

E = coefficiente di stenoecia (1-3)

K = coefficiente di abbondanza (1-5)

Il suo valore è compreso fra 0 e 20 e formalizza la possibilità di classificare la stazione attribuendola ad un livello trofico. Il livello trofico decresce da "oligotrofo" a "ipertrofico".

### **Risultati**

#### *Test eco tossicologici*

I risultati ottenuti con l'applicazione dei saggi ecotossicologici sui campioni di acqua superficiale mostrano assenza di tossicità, con percentuali di effetto comprese fra 8,2 % a -11,9%.

Inoltre i saggi applicati alla matrice sedimento fluviale mostrano che: il saggio con il *Lepidium sativum*, durante tutta la campagna di studio, ha evidenziato una spiccata biostimolazione con valori max nella stazione Va08 (confluenza Alli in Agri) con una percentuale di inibizione dell'indice di germinabilità (IG %) pari a -29% (anno 2009); il batterio *Vibrio fischeri* ha rilevato un lieve effetto tossico nel mese di agosto 2009 nei siti Va05 (confluenza casale in Agri), Va08 (confluenza Alli nella diga del Pertusillo) e Va09 (sorgente Alli), con una percentuale di effetto pari, rispettivamente a : 24,7%, 24,2% e 24,5% ( Figura 2).

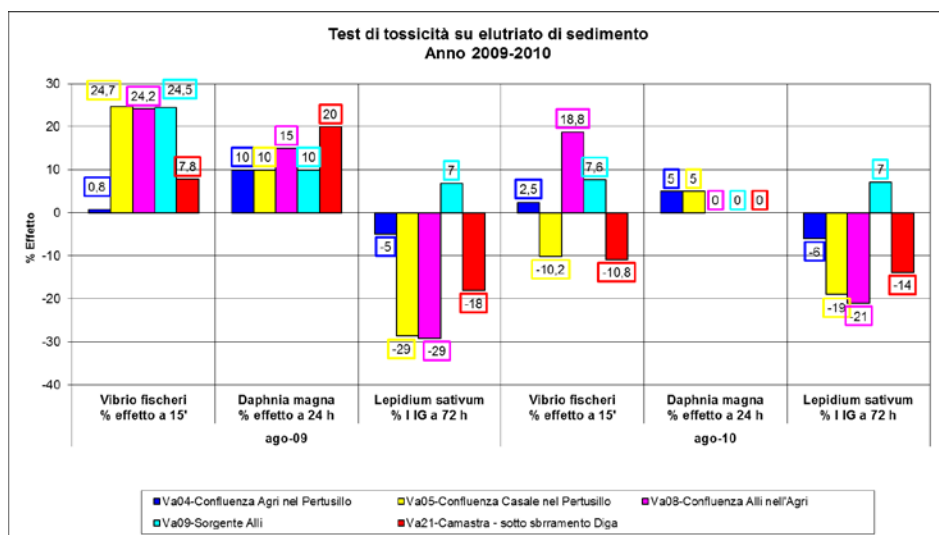


Figura 2. Test di tossicità sugli elutriati dei sedimenti

### Indice macrofitico

In tabella sono riportati i parametri abiotici rilevati nelle stazioni oggetto di studio:

Tabella 2. Parametri abiotici

	Va04	Va05	Va08	Va09	Va21
Profondità media (cm)	120	50	60	30	60
Velocità della corrente	media e laminare	media e laminare	media e laminare	media e laminare	media e laminare
% di ombreggiamento	75	40	15	50	40
Fenomeni erosivi	localizzati	poco evidenti	localizzati	localizzati	poco evidenti

La stazione Va04-confluenza del fiume Agri nella diga del Pertusillo è caratterizzata da una scarsità di vegetazione acquatica dovuta alla scarsa presenza di luce, in particolare la percentuale di copertura massima è rappresentata dalle fanerogame (83%). Il risultato del calcolo dell'indice IBMR è pari a 10,16 indicando una "elevata" trofia nella stazione Va04 nell'anno 2009 e di 10 nell'anno 2010.

La stazione Va08- confluenza del torrente Alli nel fiume Agri è caratterizzata dalla presenza di parametri abiotici tali da consentire la crescita delle macrofite acquatiche, è stata registrata infatti la più alta biodiversità vegetale (fanerogame, pteridofite, briofite ed alghe). Il risultato del calcolo dell'indice IBMR pari a 11,25 indica una media trofia nell'anno 2009, confermato anche nel 2010 (Figura 3).





Figura 3. Stazione di studio Va08.

La stazione Va21- torrente Camastra sbarramento Diga è caratterizzata dalla presenza di parametri abiotici tali da consentire la crescita della comunità macrofittica. E' presente un'alta percentuale di specie algali.

Il risultato del calcolo dell'indice IBMR,  $IBMR = 9,82$  indica una forte trofia nella stazione Va21 negli anni 2009 e 2010.

Nella stazione Va05-confluenza Casale nella diga del Pertusillo i parametri abiotici sono tali da consentire la crescita delle macrofite acquatiche, la cui comunità è risultata ben rappresentata. Il risultato del calcolo dell'indice macrofittico,  $IBMR = 9,30$  indica una elevata trofia nella stazione Va05 nel 2009, valore confermato anche l'anno seguente.

Nella stazione Va09- Sorgente torrente Alli i parametri abiotici sono tali da consentire la crescita delle macrofite acquatiche, il risultato del calcolo dell'indice  $IBMR = 11,47$  indica una moderata trofia nella stazione Va09 nel 2009. La lista floristica registrata nel 2010 non mostra variazione dei taxa, tuttavia la percentuale di copertura di macrofite risulta inferiore. Il risultato del calcolo dell'indice IBMR pari a  $11,80$  indica una moderata trofia nella stazione Va09 nel 2010.

### **Discussione**

I campioni di acqua superficiale prelevati nelle stazioni oggetto di studio, sottoposti a test con *Daphnia magna* e con *Vibrio fischeri* non hanno evidenziato tossicità. Dai risultati ottenuti si evince che le confluenze del fiume Agri, del torrente Casale hanno mostrato una più accentuata ormesi (valore max  $-29,9$  % di effetto ), dovuta sicuramente all'eccesso di nutrienti.

L'analisi dei sedimenti (elutriati) ha rilevato che, nell'anno 2009 le confluenze del Casale e dell'Alli (affluenti del fiume Agri) mostrano fenomeni di biostimolazione con il test di fitotossicità con *Lepidium sativum* ( $-29$ % di inibizione dell'IG); il saggio con *Vibrio fischeri* ha evidenziato una % di effetto intorno al 24.

Nella tabella che segue sono riportati i valori ottenuti dall'applicazione dell'indice IBMR nelle stazioni di studio.

Le confluenze Va04 Va05 e Va08 hanno mostrato un livello trofico elevato . Lo sviluppo delle macrofite individuate è influenzato dalla elevata presenza di luce, dalla temperatura , dalla bassa profondità dell'acqua e dalla velocità media-laminare, dalla composizione del substrato e soprattutto dalla disponibilità dei nutrienti presenti. La

concentrazione elevata di nutrienti è dovuta alla presenza di attività agricole nell'area circostante.

Tabella 3. Livelli trofici riscontrati nelle stazioni oggetto di studio

IBMR	livello trofico	codice stazione
IBMR $\geq$ 14	trofia molto lieve	
12 $\geq$ IBMR $\leq$ 14	trofia lieve	
10 $\geq$ IBMR $\leq$ 12	trofia media	Va09
8 $\geq$ IBMR $\leq$ 10	trofia elevata	Va04, Va05, Va08, Va21
IBMR $\leq$ 8	trofia molto elevata	

Nei grafici seguenti è riportato il confronto fra il test di fitotossicità e l'IBMR nel 2009 e nel 2010. I risultati ottenuti dall'applicazione dei saggi ecotossologici ed in particolare con il test di fitotossicità hanno confermato il giudizio espresso dall'indice macrofitico IBMR: nella stazioni Va4, Va5, Va8 e Va21 ad un fenomeno di biostimolazione corrisponde un giudizio di trofia "elevata", in entrambi gli anni di studio.

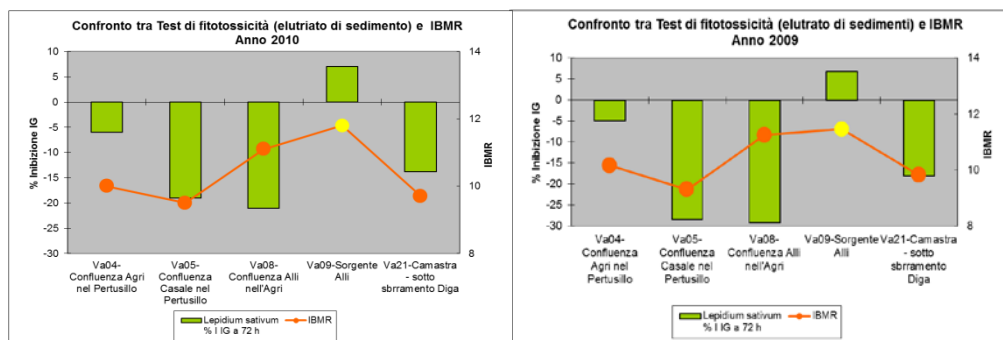


Figura 4. Confronto test di fitotossicità e IBMR (i colori dell'IBMR riportati nei grafici sono relativi alla tabella 3)

## Conclusioni

Dai risultati ottenuti si evidenzia che i test di tossicità hanno mostrato una diversa sensibilità tra gli organismi testati e soprattutto fra le diverse matrici indagate, confermando che i sedimenti forniscono una stima più realistica della presenza di sostanze tossiche biodisponibili.

I saggi ecotossologici e l'indice biologico forniscono risposte complementari utili per la valutazione della qualità degli ambienti di acqua dolce e rappresentano quindi degli affidabili metodi di indagine e degli strumenti per il monitoraggio ambientale.

## ***Bibliografia***

AFNOR, Association Française de Normalisation (2003). Norme NF T90-395, Qualité de l'eau. Détermination de l'Indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR).

APAT IRSA-CNR 29/2003 Metodi analitici per le acque- 8000 metodi ecotossicologici.

APAT RTI CTN\_TES 1/2004 Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo ed i siti contaminati.

APAT (2007) Protocollo di campionamento ed analisi per le macrofite delle acque correnti. In "Metodi Biologici per le acque. Parte I". *Manuali e Linee Guida* Roma.

EC - European Parliament (2000). Directive 2000/60/CE of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. European Community, Official Journal, Bruxelles.

J. Haury, M.-C. Peltre, M. Trémolières, J. Barbe, G. Thiébaud, I. Bernez, H. Daniel, P. Chatenet, G. Haan-Archipof, S. Muller, A. Dutartre, C. Laplace-Treytore, A. Cazaubon & E. Lambert-Servien (2006) A new method to assess water trophy and organic pollution - the Macrophyte Biological Index for Rivers (IBMR): its application to different types of river and pollution *Hydrobiologia* . 570:153-158.

# GENOTOSSICITÀ INDOTTA DA BROMURO DI RAME IN *VICIA SATIVA* L.

di L. M. Bellani<sup>a</sup>\*, L. Giorgetti<sup>b</sup>, S. Muccifora<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Siena, Italy –

\*bellani@unisi.it, muccifora@unisi.it

<sup>b</sup>Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, IBBA, UOS Pisa, Italy –

l.giorgetti@ibba.cnr.it

---

**Abstract** -. In questo lavoro è stato valutato l'effetto di dosi crescenti di bromuro di rame su semi di *Vicia sativa* L. impiegando parametri quali percentuale di germinazione, analisi dello sviluppo della plantula e test di genotossicità. I primi due parametri sono risultati essere meno sensibili in quanto differenze morfologiche e fisiologiche non sono state osservate fino alla massima concentrazione di  $\text{CuBr}_2$  saggiata ( $5 \times 10^3$  M). I test di genotossicità hanno invece rivelato la comparsa di micronuclei e di aberrazioni cromosomiche anche alle dosi più basse di bromuro di rame, dimostrando una maggiore sensibilità di questo approccio e incoraggiandone l'uso in studi di monitoraggio ambientale.

Parole chiave: *Vicia sativa* L., bromuro di rame, germinazione, genotossicità

## Introduzione

Il rame è un micronutriente essenziale coinvolto in numerosi processi metabolici delle piante (Harrison et al. 1999; Lolkema e Vooijs, 1986). Quando il rame è assunto in eccesso può alterare la stabilità e la permeabilità delle membrane (Peng et al., 2005), alcuni processi metabolici quali la fotosintesi e la respirazione (Alaoui-Sossé et al., 2004; Vinit-Dunand et al., 2002), causare alterazioni della struttura della cromatina (Kahle, 1993; Punz e Sieghardt, 1993), anomalie cromosomiche e della divisione cellulare (Jiang et al., 2001; Souguir et al., 2008).

La contaminazione ambientale da metallo pesante può essere valutata attraverso parametri che mettano in relazione la percentuale di germinazione dei semi e lo sviluppo della plantula con l'analisi dell'attività mitotica e delle aberrazioni citogenetiche su meristemi apicali vegetali (Bhat et al., 2012; Souguir et al., 2008). Il presente studio valuta l'influenza di diverse concentrazioni di bromuro di rame sulla germinazione, sulle variazioni dell'indice mitotico e sulla presenza di anomalie citogenetiche in semi di *Vicia sativa* L. Questa specie è caratterizzata da un basso numero cromosomico ( $2n=12$ ), che la rende un materiale idoneo a studi di citogenetica.

## Materiali e metodi

Semi di *Vicia sativa* L. cv *nitra*, donati dalla Continental Semences di Traversetolo (Pr) di peso omogeneo (0,07 gr ciascuno) sono stati posti in piastre Petri contenenti acqua distillata o bromuro di rame ( $\text{CuBr}_2$ )  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$  M, al buio a 25°C. Dopo 48 ore e 72 ore è stata rilevata la percentuale di germinazione e misurata la lunghezza dell'ipocotile. A 48 ore di imbibizione gli apici radicali sono stati fissati in

Carnoy (etanolo: acido acetico glaciale 3:1), sottoposti a idrolisi con HCl 1N per 8 min a 60°C, colorati con il reattivo di Schiff per 45 min e strisciati su vetrino. Almeno 1000 nuclei per ogni vetrino sono stati analizzati per rilevare l'indice mitotico (n° di mitosi per 100 nuclei), la frequenza delle varie fasi della mitosi e la presenza di eventuali anomalie. Per ogni tesi sperimentale sono stati analizzati 5 vetrini e i risultati espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

### ***Risultati***

I semi di *V. sativa* delle piastre di controllo raggiungono il 100% di germinazione a 48 ore di inibizione; in tutti i campioni trattati alle diverse concentrazioni di rame il 100% di germinazione è raggiunto a 72 ore. Lo sviluppo della plantula dei semi trattati con  $\text{CuBr}_2$   $10^5$  e  $10^4$  M è analogo a quello del controllo.

Contrariamente i semi trattati con  $\text{CuBr}_2$   $10^3$  e  $5 \times 10^3$  M presentano una riduzione nello sviluppo della plantula che risulta essere particolarmente evidente nel trattamento con  $\text{CuBr}_2$  più elevato. In questo trattamento l'allungamento della radichetta è inibito.

L'analisi citogenetica effettuata sulle radici dei semi di *V. sativa* trattati ha evidenziato la comparsa di micronuclei a tutte le concentrazioni di  $\text{CuBr}_2$  saggiate. Il trattamento con  $\text{CuBr}_2$   $5 \times 10^3$  M induce una sensibile riduzione nell'indice mitotico rispetto al controllo ed agli altri trattamenti. L'analisi citologica degli apici meristemati radicali ha rivelato inoltre alterazioni nella organizzazione e nella morfologia dei cromosomi in proporzione alla concentrazione di rame: sono state osservate C-metafasi, anafasi con ponti, frammenti cromosomici e comparsa di nuclei poliploidi. I nuclei a riposo osservati nei campioni trattati con  $\text{CuBr}_2$   $5 \times 10^3$  M mostrano nucleolo lobato e cromosomi "sticky".

### ***Discussione***

I dati raccolti in questo lavoro indicano che il rame fino alla concentrazione di  $5 \times 10^3$  M non influenza la germinazione dei semi di *Vicia sativa* L. L'effetto negativo però è visibile sullo sviluppo della plantula alle concentrazioni di  $\text{CuBr}_2$   $10^3$  e  $5 \times 10^3$  M. Contrariamente il  $\text{CuBr}_2$  fornito alla concentrazione di  $10^4$  M, sembra stimolare lo sviluppo della plantula. Le analisi citogenetiche hanno evidenziato che l'indice mitotico non subisce variazioni significative fino alla concentrazione di  $\text{CuBr}_2$   $5 \times 10^3$  M mentre sono presenti anomalie citogenetiche fin dalle dosi più basse. In particolare è stata osservata la presenza di micronuclei e di anomalie cromosomiche in tutti i trattamenti. La presenza di cromosomi sticky e di estrusione di cromatina è stata rilevata maggiormente alla concentrazione più elevata indicando che l'esposizione delle piante a questa dose può indurre una variabilità genomica e determinare in seguito una situazione sfavorevole per la crescita e la riproduzione della pianta.

### ***Conclusioni***

Questi dati indicano che il bromuro di rame ha un effetto fitotossico e clastogenico in *V. sativa*. I parametri di genotossicità sono risultati particolarmente sensibili e confermano l'importanza di questo tipo di indagine in studi di monitoraggio ambientale in sinergia con quelli fisiologici quali germinazione e sviluppo della plantula.

### ***Bibliografia***

Alaoui-Sossé B., P. Genet, F. Vinit-Dunant, M.L. Toussaint, D. Epron, P. Badot (2004) Effect of copper on growth in cucumber plant (*Cucumis sativus*) and its relationship

with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, vol. 166: 1213-1218.

Bhat T.M., S. Choudhary, M.Y.K. Ansari, A. Aslam, R. Aslam (2012) Genotoxicity and molecular screening of proteins in root tip cells of *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek var- Azad) under cadmium stress condition. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, vol 4: 46-51.

Harrison M.D., C.E. Jones, C.T. Dameron (1999) Copper chaperones: function structure and copper-binding properties. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 4: 145-153.

Jiang W., D. Liu, X. Liu (2001) Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biologia Plantarum*, vol. 44: 105-109.

Kahle H. (1993) Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 33:99-119.

Lolkema P.C., R. Vooijs (1986) Copper tolerance in *Silene cucubalus*: Subcellular distribution of copper and its effects on chloroplast and plastocyanin synthesis. *Planta*, vol. 167: 30-36.

Peng H., X. Yang, S. Tian (2005) Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University Science*, vol. 6B: 311-318.

Punz W.F., H. Sieghardt (1993) The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environmental Experimental Botany*, vol. 33: 85-98.

Souguir D., E. Ferjani, G. Ledoigt, P. Goupil (2008). Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper induced genotoxicity. *Protoplasma*, vol. 233: 203-207.

Vinit-Dunand F., D. Epron, B. Alaoui-Sossé, P.M. Badot (2002) Effects of copper on growth and of photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science*, vol. 163: 53-58.

# TEST TOSSICOLOGICI SU *VICIA FAB* L. PER LA VALIDAZIONE DI PROCESSI DI BIORISANAMENTO

di L. Giorgetti<sup>a</sup>\*, S. Di Gregorio<sup>b</sup>, R. Lorenzi<sup>b</sup>, C. Corsi<sup>b</sup>, M. Ruffini Castiglione<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, IBBA, UOS Pisa, Italy –

\* l.giorgetti@ibba.cnr.it

<sup>b</sup> Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Italy –sdigregorio@biologia.unipi.it, rlorenzi@biologia.unipi.it, claudia.corsi985@gmail.com, mruffini@biologia.unipi.it

---

**Abstract** -. Lo scopo di questa ricerca è stato la valutazione dell'efficacia del processo di abbattimento della concentrazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in una biopila in termini di riduzione della tossicità della matrice restituita. Per questo motivo sono stati prelevati campioni di terreno a diversi intervalli di tempo dall'inizio del trattamento in biopila, chimicamente caratterizzati, per il monitoraggio e la valutazione del possibile effetto fito-genotossico sul sistema modello *Vicia faba* L. Sono stati valutati parametri biologici come la germinazione e l'allungamento radicale oltre al possibile effetto genotossico a livello dei meristemi apicali radicali, tramite test del micronucleo e indice di aberrazione. Confrontando i risultati ottenuti è stato rilevato che l'effetto fito-genotossico del terreno contaminato si riduce progressivamente dopo trattamento in biopila.

Parole chiave: fitotossicità, genotossicità, *Vicia faba* L., biorisanamento, Idrocarburi Policiclici Aromatici.

## *Introduzione*

I saggi ecotossicologici sono impiegati sia nella valutazione della tossicità delle diverse matrici sia nel valutare l'efficacia della bonifica di una matrice nel tempo. Diversi organismi possono essere utilizzati in test eco tossicologici in laboratorio, oppure possono essere osservati nel loro ambiente naturale e rappresentare gli indicatori delle condizioni ambientali. Le piante possono essere un buon indice di qualità delle diverse matrici ed essere utilizzate sia come standard nelle operazioni di bonifica di terreni contaminati ma anche nella valutazione della qualità dei suoli. Infatti la sola caratterizzazione chimica di un suolo inquinato non consente di esprimere valutazioni relative al pericolo per gli organismi viventi né di determinare la tossicità della matrice legata agli inquinanti e ai loro intermedi di degradazione, spesso non conosciuti. Perciò è di fondamentale importanza valutare gli effetti che i terreni contaminati possono avere su sistemi biologici di riferimento attraverso test eco-tossicologici, i quali forniscono informazioni importanti sulla biodisponibilità ed eventuali azioni sinergiche degli inquinanti verso i sistemi biologici stessi. Nel caso della sperimentazione in oggetto, i test eco-tossicologici sono stati utilizzati per seguire la fase finale di un processo di biorisanamento in biopila di un suolo contaminato da IPA, molecole particolarmente tossiche, di derivazione naturale ma soprattutto antropica, rilasciate nell'ambiente in seguito a processi di combustione incompleta. Da studi precedenti era emerso che il suolo esaminato inizialmente risultava contaminato con 5431 ppm di una miscela di IPA. In seguito a trattamento in biopila con specie microbiche

opportunamente selezionate capaci di utilizzare IPA come unica fonte di carbonio, si era osservata una progressiva e significativa riduzione della contaminazione fino ad un valore che rientra nei limiti stabiliti dal DM 471/99 per i siti ad uso commerciale ed industriale (D'Anteo, 2011). Nel lavoro presentato, i test di fitotossicità e genotossicità realizzati con *Vicia faba* L. su elutriati sono risultati essere un buon approccio per il monitoraggio dei processi biodegradativi e dell'abbattimento della tossicità degli IPA nella matrice suolo.

## ***Materiali e Metodi***

### *Campionamento dei terreni e preparazione degli elutriati*

Aliquote di terreno sono state prelevate dalla biopila, campionando a differenti intervalli di tempo dall'inizio del trattamento di biorisanamento: all'inizio della sperimentazione (T0), alla 34° settimana dall'inizio della sperimentazione (T34), alla 41°, 45°, 47° e 50° settimana [campioni T41, T45, T47, T50]. Alla 39° settimana è stata effettuata una bioaugmentation con batteri specificamente selezionati per la degradazione degli IPA (D'Anteo 2011). Gli elutriati sono stati preparati dalla stessa matrice solida derivante dal campionamento sopra descritto e conservati in frigorifero per una notte a 4°C oppure a -20°C per stoccaggi più lunghi (Margesin and Schinner 2005)

### *Materiale vegetale per test tossicologici*

Tutti i test per valutare il grado di tossicità degli IPA sono stati condotti utilizzando semi di *Vicia faba* L. appartenenti ad un unico lotto e conservati a 10°C. Prima di ogni esperimento sono stati trasferiti a temperatura ambiente, lasciati over night in acqua corrente e posti a germinare per 72 ore, previa eliminazione dei tegumenti, nelle diverse condizioni e per i diversi tipi di test. Saggio di germinazione e sviluppo della plantula - Per misurare la tossicità degli IPA è stato scelto il saggio di germinazione e allungamento radicale, condotto a partire da semi di *V. faba* (IRSA 1996). 20 semi sono stati incubati in capsule Petri, in triplicato, alla temperatura di 25°C per 72 ore al buio con i diversi elutriati e con acqua deionizzata (controllo). Terminata l'incubazione sono stati conteggiati i semi germinati e misurate le lunghezze della radice. Al termine delle misurazioni, l'indice di germinazione percentuale, Germination Index (GI %), del seme è stato calcolato in percentuale usando la seguente formula:  $GI = \frac{Nc \times Lc}{Np \times Lp} \times 100$  dove: Nc: media del numero di germinati nei trattati; Lc: media delle lunghezze della radice dei germinati nei trattati; Np: media del numero di germinati nel controllo; Lp: media delle lunghezze della radice dei germinati nel controllo. Indici di germinazione compresi tra il 50% ed il 100% sono considerati normali e quindi come risultato di una situazione di non tossicità della matrice (IRSA,1983).

### *Test di genotossicità su radici di *V. faba* L.*

Apici radicali, prelevati dopo 72 ore di incubazione nei diversi elutriati, sono stati colorati seguendo la tecnica di Feulgen e dopo l'allestimento dei vetrini, è stata eseguita una accurata analisi citologica al microscopio ottico prendendo in considerazione i seguenti parametri: a) indice mitotico (rapporto espresso in % tra numero medio di divisioni mitotiche su 1000 cellule analizzate); b) frequenza di eventuali anomalie mitotiche (indice di aberrazione % = rapporto espresso in % tra numero medio di divisioni mitotiche anomale su 1000 cellule analizzate); c)



frequenza di micronuclei (numero medio di micronuclei osservati in 1000 cellule analizzate, test del micronucleo).

## **Risultati**

Al fine di valutare la tossicità iniziale del terreno contaminato da IPA (prima di applicare il processo di biorisanamento in biopila) e successivamente durante tutto l'arco della sperimentazione, sono state condotte prove di fitotossicità utilizzando il saggio di germinazione e sviluppo della plantula (IRSA 1996). Il test è stato condotto su semi di *V. faba* adeguatamente germinati su matrice liquida rappresentata dall'elutriato derivato da campioni di terreno prelevato dalla biopila a tempi diversi, valutando la situazione iniziale di massima contaminazione da IPA fino alla situazione finale, dopo 50 settimane di trattamento in cui l'indice di germinazione % (IG%) è praticamente paragonabile a quello del controllo (Tabella 1).

Per quanto riguarda la genotossicità degli elutriati, corrispondenti al terreno a diverse fasi di biorisanamento, è stata effettuata un'accurata analisi citogenetica andando a valutare i seguenti parametri: l'indice mitotico, l'indice di aberrazione e la frequenza di micronuclei. I rispettivi risultati sono riportati nella Tabella 2, dalla quale risulta una progressiva riduzione della genotossicità della matrice fino a raggiungere livelli paragonabili al controllo dopo 47-50 settimane di trattamento in biopila.

*Tabella 1. Prove di Fitotossicità. Gli indici di germinazione percentuale (IG %) sono calcolati sull'abase della lunghezza media della radice e media dei semi germinati sui diversi elutriati corrispondenti ai diversi campionamenti della sperimentazione. Un indice di germinazione percentuale compreso tra il 50 e il 100 % non è considerato indice di tossicità.*

INDICE di GERMINAZIONE (IG%)						
Controllo	T0	T34	T41	T45	T47	T50
100%	123%	48%	26%	121%	106%	98%

## **Discussione**

Negli studi eco-tossicologici condotti sulle piante la stima dell'indice di germinazione % risulta essere uno dei parametri principali per indicare i livelli di fitotossicità (APAT 2004). Gli indici di germinazione (IG%) dipendono sia dai valori della lunghezza della radice sia dalla germinabilità del seme. Dai nostri studi è emerso che gli inquinanti presenti nei diversi elutriati hanno indotto alterazioni sull'IG% fino al campione T47; alla fine della sperimentazione in biopila tale indice è ritornato a valori normali e simili a quelli del controllo. Questo potrebbe indicare un reale abbattimento delle sostanze responsabili degli effetti tossici osservati. Dalle prove di fitotossicità è possibile concludere che i livelli di tossicità del terreno sono cambiati nel tempo con un andamento variabile (massimo di tossicità al T41) ma in ogni modo, alla fine del trattamento, i livelli si sono chiaramente ridotti. Dalle prove di genotossicità è emerso che le sostanze presenti nella biopila, fino alla 45<sup>esima</sup> settimana, sono in grado di inibire pesantemente l'attività mitotica delle cellule meristematiche degli apici di *Vicia faba*. Questo risultato potrebbe essere spiegato con l'aumento della concentrazione di alcuni intermedi di degradazione non identificati che si sarebbero formati in questa fase sperimentale ma non rilevabili con le determinazioni

analitiche. Inoltre, l'aumento della solubilità degli IPA porta ad una loro maggiore biodisponibilità anche per gli apici radicali delle piante.

Tuttavia le prove di genotossicità effettuate con gli elutriati corrispondenti ai terreni prelevati negli stadi finali, hanno evidenziato che l'indice mitotico riassumeva valori che poco si discostano dai valori registrati nel controllo. Questo dimostra l'efficacia del processo di bioremediation per la riduzione della genotossicità del terreno sottoposto al trattamento in biopila.

Dal test delle aberrazioni è emerso che il campione T34 era caratterizzato dal maggior numero di figure mitotiche aberranti, principalmente le C-metafasi. Evidentemente le sostanze presenti in questo elutriato inducevano alterazioni della formazione e/o della struttura del fuso mitotico ostacolando la corretta disposizione dei cromosomi sul piano equatoriale e successivamente la loro corretta ripartizione nelle cellule figlie (effetto aneugenico). Non sono emerse differenze significative tra il controllo ed i campioni T47 e T50 e questo ha fatto supporre che nelle fasi finali della sperimentazione, le sostanze capaci di indurre anomalie durante la mitosi, siano state completamente degradate dai consorzi microbici presenti nel terreno, confermando ancora una volta la capacità della biopila nel detossificare il terreno. Lo stesso andamento è stato osservato in seguito alla valutazione del test del micronucleo. Infatti nelle fasi finali di sperimentazione è stata osservata una riduzione del numero dei micronuclei indotti dagli inquinanti presenti negli elutriati. In accordo con i risultati dell'indice mitotico e delle aberrazioni anche il numero medio di micronuclei massimo è stato registrato sempre nel campione T34.

*Tabella 2. Prove di genotossicità, effettuate su cellule degli apici radicali emessi da semi di V. faba germinati sugli elutriati ottenuti dai terreni campionati durante la sperimentazione. L'indice mitotico, esprime il valore medio del numero di nuclei in divisione su 100 nuclei; l'indice di aberrazione rappresenta il valore medio del numero di divisioni mitotiche anomale su 100 nuclei, mentre la frequenza di micronuclei esprime il numero medio di micronuclei su 1000 cellule analizzate.*

INDICI di GENOTOSSICITA'							
	Contr.	T0	T34	T41	T45	T47	T50
Indice mitotico [%]	14,27± 1,96	9,62± 2,01 **	5,98± 1,38 **	5,95± 0,43 **	4,22± 0,12 **	11,81± 1,62 **	11,92± 0,51 **
Indice di aberrazione [%]	0,38± 0,02	2,67± 0,18 *	3,83± 1,02 **	2,46± 0, 22 **	2,42± 1,12 **	1,18± 0,53	0,95± 0,47
Frequenza micronuclei [% <sub>60</sub> ]	2,26± 1,12	13,58± 5,33 **	33,33±15, 02 ***	12,94± 1,09 *	17,88± 4,87 **	7,23± 2,64 *	3,88± 1,55

## Conclusioni

In questo lavoro gli effetti del biorisanamento di un terreno contaminato attraverso una biopila hanno portato ad un abbattimento degli IPA fino a 99,5 mg/Kg, valore che rientra nei limiti stabiliti dal DM 471/99 per i siti ad uso commerciale ed industriale. Questo dimostra l'efficienza della biopila nell'abbattimento degli

inquinanti confermando i risultati molto soddisfacenti ottenuti in altre sperimentazioni sia su scala ridotta sia scala più ampia (Vladimir P. Beškoski et al. 2011). Tuttavia un programma di biorisanamento raggiunge il suo obiettivo finale se riesce a ottenere una significativa diminuzione della tossicità delle matrici rilevabile dalle analisi chimiche ma soprattutto attraverso sistemi biologici sensibili capaci di dimostrare l'abbattimento della tossicità. *V. faba* è una delle piante superiori più utilizzate in studi ambientali in quanto estremamente sensibile alle diverse concentrazioni di inquinanti inorganici ed organici. In particolare è stata dimostrata la sua maggiore sensibilità rispetto ad altre piante superiori nei test ecotossicologici condotti per valutare gli effetti genotossici degli IPA (Cotelle and Masfarauud 1999, Marcato et al. 2009). Inoltre i test di genotossicità sulle piante superiori come *V. faba* sono stati accettati e raccomandati dall'US-EPA come un'utile alternativa ai principali saggi per la valutazione del danno genetico condotti su sistemi animali (Grant 1982, Ma 1982, Grant 1999, Ma 1999). I risultati ottenuti in questa ricerca confermano ulteriormente la validità del sistema di *V. faba* per studi di fitossicità e genotossicità in relazione al monitoraggio delle diverse fasi temporali di un processo di risanamento in biopila di un terreno contaminato.

### **Bibliografia**

- APAT, 2004. Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici, 2004. Proposta di guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati, utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. RTI CTN\_TES 1/2004.
- Cotelle S., Masfarauud J.F., 1999. Assessment of genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia*, micronucleus assay. *Mutant Res* 426:167-171.
- D'Anteo S. 2011. Biorisanamento di un suolo contaminato da idrocarburi policiclici aromatici mediante un impianto pilota di biopila, tesi di laurea magistrale. Università di Pisa
- Grant W.F., 1982. Chromosomal aberration assay in *Allium*. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutat. Res.* 99: 273-291. Ma 1982.
- Grant W.F., 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations - A brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat Res* 426:107-112
- IRSA-CNR, 1996. Metodi analitici. Saggi di Tossicità: Editoriale. *Biologia ambientale* n°6/1996. APAT 2004
- IRSA, 1983. Analisi della fitossicità della sostanza organica in decomposizione mediante biosaggio *Lepidium sativum*. Quaderno IRSA, 64 Metodi analitici per i fanghi: parametri biochimici e biologici:8.1-8.3
- Ma T.H., 1999. The international program on plant bioassay and the report of the follow-up study after the hand-on workshop in China. *Mutat. Res.* 426: 103-106.
- Marcato Romain C.E., Guirese M., Cecchi M., Cotelle S., Pinelli E., 2009. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere* 77: 345-350.
- Margesin R., F. Schinner 2005. Manual for soil analysis: monitoring and assessing soil bioremediation. *Soil Biology* Vol 5. Springer Verlag, Berlin
- Vladimir P. Beškoski, Gordana Gojgić-Cvijović, Jelena Milić, Mila Ilić, Srdjan Miletić, Tatjana Šolević, Miroslav M. Vrvić, 2011. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) - A field experiment. *Chemosphere* 83: 33-40.

# CARATTERIZZAZIONE (CHIMICO FISICA ECOTOSSICOLOGICA) ED ANALISI RISCHIO ECOLOGICO DI BIOCIDI ANTIVEGETATIVI NEL SUD DEL MAR ADRIATICO PROGETTO CARISMA (COFINANZIATO DAL MAE) PRESENTAZIONE DELLE ATTIVITÀ DEL PRIMO ANNO

*di S. Manzo<sup>a</sup>, G. Ansanelli<sup>b</sup>, S. Chiavarini<sup>b</sup>, G. Di Landa<sup>a</sup>, M. Fantini<sup>b</sup>, B. Lanza<sup>a</sup>, P. Massanisso<sup>b</sup>, C. Minopoli<sup>a</sup>, E. Nardi<sup>b</sup>, L. Parrella<sup>b</sup>, M. Pezza<sup>b</sup>, A. Salluzzo<sup>a</sup>, Si. Schiavò<sup>a</sup>, A. Tabaku<sup>d</sup>, P. Aleski<sup>d</sup>, P. Lazo<sup>d</sup>.*

<sup>a</sup> ENEA CR Portici, Piazz.le E. Fermi 1 80055 Portici (Na) - sonia.manzo@enea.it

<sup>b</sup> ENEA/UTPRA-GEOC, CR Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Roma

<sup>c</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II-Criacq

<sup>d</sup> Accademia delle scienze Tirana (Albania)

---

**Abstract** -. Il progetto CARISMA prevede una caratterizzazione chimica, fisica ed ecotossicologica di un tratto di mare compreso tra Puglia ed Albania al fine di determinare il rischio ecologico connesso all'utilizzo di pitture antivegetative. In questo lavoro sono riportati gli obiettivi generali del progetto e la sintesi delle attività previste per il 2012 ed attualmente in corso. I risultati delle campagne di prelievo nei siti rappresentativi della contaminazione da biocidi (porti) in Puglia ed Albania permetteranno di effettuare una prima valutazione integrata necessaria alla stima del rischio secondo una tecnica di tipo probabilistico che tenga conto delle incertezze e della variabilità delle informazioni raccolte ed inoltre agevererà la pianificazione ed ottimizzazione delle campagne stagionali previste nel proseguimento del progetto.

Parole chiave: Antifouling, biocidi, Puglia, Albania, Ecological Risk Assessment

## **Introduzione**

Il progetto CARISMA (Caratterizzazione (chimico fisica ecotossicologica) ed Analisi Rischio ecologico di biocidi antivegetativi nel Sud del Mar Adriatico) è stato selezionato tra i Progetti di grande rilevanza nell'ambito dell'Accordo di Collaborazione Scientifica e Tecnologica fra la Repubblica Italiana e la Repubblica di Albania e cofinanziato dal Ministero degli Affari Esteri (MAE).

Il principale obiettivo del progetto è incrementare la conoscenza della qualità del tratto di mar Adriatico su cui si affacciano Italia ed Albania e di valutare, in particolare, l'impatto dovuto all'utilizzo delle vernici antivegetative.

Ogni struttura posta in ambiente acquatico viene rapidamente interessata da depositi di organismi animali e vegetali (fouling). Tali formazioni costituiscono un problema per le imbarcazioni rallentandone la velocità ed aumentandone il consumo di carburante. Le pitture antivegetative, riducendo gli effetti del fouling sulle imbarcazioni, generano alcuni benefici ambientali come la riduzione dell'emissione di gas serra e del trasporto di specie invasive mediante le carene delle barche. Tuttavia, esse possono rappresentare un rischio per l'ambiente per la presenza nelle loro formulazioni di composti organici con azione biocida. Per decenni il biocida più utilizzato è stato il

tributilstagno (TBT), dal 2008 vietato in tutto il mondo a causa dei suoi effetti avversi su organismi non target. Attualmente la maggior parte delle pitture antivegetative contiene rame come principio attivo ed un biocida "booster" per rafforzarne l'efficacia. I più diffusi booster sono Irgarol, Diuron, Sea Nine, Dichlofluanid, Chlorothalonil, e Zinc pyrithione.

Il rilascio del biocida in mare può causare un progressivo accumulo di sostanze potenzialmente tossiche nella colonna d'acqua e, conseguentemente, nei sedimenti e nel biota. I biocidi antivegetativi possono generare un severo degrado ambientale con conseguenze sulla qualità della vita delle popolazioni costiere, così come sull'economia, a causa degli effetti associati con la pesca ed il turismo. La distribuzione e gli effetti di tali biocidi sono ancora poco conosciuti suggerendo la necessità di monitoraggi sia a livello regionale che nazionale.

Italia ed Albania affacciano sullo stesso braccio di mare (sud del Mar Adriatico) con distanze in alcuni tratti particolarmente ridotte. Pertanto la misura dei livelli di concentrazione in mare dei principali agenti biocidi rilasciati dalle pitture antivegetative, insieme con la definizione dell'effetto ecotossicologico dovuto all'esposizione a tali contaminanti, permetterà di effettuare una valutazione del rischio ecologico (ERA) per gli organismi marini presenti nelle zone costiere italiane ed Albanesi del sud del Mar Adriatico.

Il progetto è articolato su tre anni ed ha avuto inizio nel giugno del 2012; il primo anno di attività ha avuto lo scopo di:

1. Definire quali biocidi sono contenuti delle pitture antivegetative principalmente utilizzate in Puglia ed in Albania attraverso l'utilizzo di indagini e questionari per i soggetti interessati (produttori, rivenditori cantieri navali, pescatori);
2. Definire i livelli di concentrazione di alcuni biocidi attualmente più in uso in Puglia ed in Albania sia nelle acque che nei sedimenti marini campionati;
3. Definire i livelli di TBT negli stessi siti e valutarne il bioaccumulo nel biota e nei sedimenti marini;
4. Ottimizzare il sistema di campionamento passivo e compararne i risultati con le tecniche di campionamento puntuale;
5. Applicare una batteria di test ecotossicologici per definire i saggi più appropriati alla valutazione degli effetti legati alla presenza di tali contaminanti
6. Definire gli elementi su cui si basa la valutazione del rischio ecologico, provocato dalla potenziale contaminazione degli ecosistemi acquatici costieri italiani ed albanesi del sud del Mar Adriatico, in seguito all'utilizzo di vernici antivegetative per il trattamento degli scafi delle imbarcazioni turistiche e commerciali.

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

#### *Preparazione e somministrazione di questionari conoscitivi*

Sono stati approntati dei questionari per ottenere una stima delle quantità di vernici antivegetative impiegate annualmente e per comprendere quali siano i biocidi più utilizzati. In particolare, è stato preparato un questionario per le capitanerie dei porti nei quali sono stati effettuati i campionamenti, per conoscere il numero ed il tipo di barche stanziali e stagionali, ed un questionario rivolto ai cantieri presenti nei siti indagati, per raccogliere informazioni sui prodotti antivegetativi utilizzati e sui metodi di rimozione e di applicazione degli stessi. Ulteriori dati sulle quantità e le tipologie di vernici antifouling impiegate deriveranno dalle interviste ai rivenditori locali. Un altro questionario è stato sottoposto a pescatori e diportisti, sia per ottenere informazioni sulla frequenza di manutenzione e di utilizzo dell'imbarcazione, sia per conoscere il

livello di consapevolezza degli intervistati relativamente ai danni ambientali arrecati dalle loro attività nautiche.

### *Siti di campionamento*

Quali siti di campionamento sono stati scelti i porti, luoghi presumibilmente molto inquinati in quanto caratterizzati da un intenso traffico nautico e da uno scarso ricambio d'acqua, in modo da determinare quali siano le concentrazioni massime di biocidi a cui risultano esposti gli organismi marini locali.

Sia per la Puglia che per l'Albania sono stati monitorati porti medio-grandi, frequentati soprattutto da pescherecci ed imbarcazioni da diporto.

I campionamenti sono stati effettuati nella prima metà di settembre, prima della fine della stagione estiva, periodo in cui l'attività nautica è più intensa e, pertanto, i livelli dei biocidi antivegetativi dovrebbero essere esibire i valori più elevati.

In Figura 1 sono indicati i siti italiani ed albanesi selezionati per il monitoraggio, mentre in tabella sono riportate le coordinate geografiche ed i principali parametri chimico fisici dei punti in cui sono stati eseguiti i campionamenti.

### *Campionamento acqua sedimento biota*

In ogni punto, mediante un campionatore per acque superficiali alla profondità di 50 cm, sono stati raccolti 4 L di acqua marina, in bottiglie di vetro da 1 L opportunamente pretrattate e 250 ml in bottiglie di plastica. Laddove possibile sono stati prelevati circa una trentina di ricci di mare, 1 kg di mitili e, mediante una benna di Van Veen in acciaio, circa 1 kg di sedimento. Ulteriori 5 litri di acqua marina sono stati prelevati ad un miglio dal porto di Trani, dove, presumibilmente, la contaminazione è trascurabile. Tutti i campioni sono stati trasportati a 4°C.

Per i campioni acquosi sono state effettuate delle misure in situ di temperatura, conducibilità, pH ed ossigeno disciolto, mediante un misuratore multiparametrico portatile.



Fig. 1 Porti campionati in Puglia ed in Albania

Località	Coordinate geografiche	T (°C)	O <sub>2</sub> (% sat.)	Salinità (mg/L)	pH
<b>Italia</b>					
Manfredonia	41°37'27.94"N - 15°55'13.49"E				8.01
Manfredonia banchina	41°37'30.73"N - 15°54'53.60"E	28,5	81	34,9	7.95
Margherita di Savoia	41°23'17.19"N - 16°8'2.77"E				8.15
Margherita di Savoia banchina	41°23'02.63"N - 16°07'55.19"E	27,3	39		7.81
Trani	41°16'51.399"N - 16°25'17.234"E				7.96
Trani banchina	41°16'44.966"N - 16°25'10.346"E	26,7	65	36,6	7.87
1 miglio dalla costa di Trani	41°17'30.000"N - 16°26'0.000"E				
<b>Albania</b>					
Valona	40°29'4.800"N - 19°25'56.200"E	26,8	89	36,1	8.05
Valona banchina	40°29'3.300"N - 19°25'51.720"E	26,7	108	36,1	8.00
Durezzo	41°18'22.800"N - 19°27'19.740"E	25,4	85	36,2	8.13
Durezzo banchina	41°18'10.440"N - 19°27'14.100"E			36,3	8.04
Shengjin	41°48'42.900"N - 19°35'17.400"E	26	119	37,8	8.10
Shengjin banchina	41°48'49.320"N - 19°35'11.400"E	26	84	37,7	7.88

### *Campionatori passivi*

I campionatori passivi, utilizzati per la valutazione integrata nel tempo della concentrazione di composti organici di interesse ambientale, sono dispositivi che impiegano diverse sostanze adsorbenti in grado di monitorare la presenza di diversi analiti nell'ambiente marino.

I dispositivi adsorbenti utilizzati per il presente lavoro sono le membrane SPMD (semipermeable membrane device) e i sistemi POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers). I sistemi SPMD, costituiti da un sostegno di acciaio su cui viene montata una membrana permeabile riempita con una quantità nota di trioleina, sono utilizzati per monitorare la presenza di composti lipofili, mentre i POCIS, costituiti da un sostegno di acciaio su cui vengono montati dei dischi adsorbenti a base di un copolimero polistirene divinilbenzene miscelato con una resina carboniosa, sono

utilizzati per monitorare la presenza di composti idrofili. I due dispositivi sono entrambi collocati all'interno di un cestello protettivo in acciaio) e quindi immersi in acqua per un periodo di campionamento tra i 15 e i 30 giorni.



Sistema SPMD



Sistema POCIS



Cestello di acciaio  
protettivo

I sistemi SPMD sono utilizzati per il campionamento di composti organici con un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua  $\log K_{ow}$

maggiore di 3, mentre i POCIS sono utilizzati per il campionamento di composti con  $\log K_{ow}$  inferiore a 3. Alcuni dei composti target del presente lavoro sono quindi determinati attraverso l'utilizzo degli SPMD, il TBT ( $\log K_{ow}$  4.70) in particolare, mentre altri, come il Diuron ( $\log K_{ow}$  2.60), sono determinati mediante l'utilizzo dei POCIS.

#### *Metodi analitici per la definizione dei biocidi e del TBT*

I campioni acquosi sono stati filtrati su membrane di acetato di cellulosa da  $0,45\mu\text{m}$ . La preconcentrazione degli analiti target è stata effettuata mediante estrazione in fase solida [solid phase extraction - SPE], utilizzando cartucce contenenti una fase stazionaria polimerica (Lichrolut EN, 200 mg). Su ogni cartuccia sono stati caricati 500 ml di campione e gli analiti, trattenuti sulla fase stazionaria, sono stati eluiti con metanolo. Gli estratti sono stati portati a secco, sotto un leggero flusso di azoto, a  $35^{\circ}\text{C}$ , e ricostituiti con  $45\mu\text{l}$  di una soluzione metanolo/ acetato di ammonio 10 mM, 1:1 v/v e  $50\mu\text{l}$  di standard interno (atrazinad5, 2 mg/l in metanolo).

L'analisi qualitativa e quantitativa dei biocidi (irgarol e diuron) è stata eseguita mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), con una sorgente di ionizzazione electrospray (ESI), operante in modalità ioni positivi. La separazione cromatografica degli analiti è stata realizzata con un gradiente lineare su di una colonna a fase inversa (C18), impiegando come eluenti acetato di ammonio 10 mM e metanolo, ad un flusso di  $0,75\text{ ml/min}$ . Per ogni composto sono rilevati due o tre ioni (di quantificazione e di conferma), in modalità SIM (selected ion monitoring) (Di Landa et al 2009).

I sedimenti sono stati liofilizzati e setacciati a 2 mm. La preparazione dei campioni per le analisi mediante LC-MS, consiste in un'estrazione degli analiti target con solventi organici, in bagno ad ultrasuoni a  $50^{\circ}\text{C}$ , e successiva purificazione mediante SPE.

Il metodo per la determinazione dei composti organostannici è stato sviluppato e ottimizzato presso i laboratori dell'ENEA, unità UTPRA. Al campione in esame viene aggiunta una quantità appropriata di soluzione arricchita di  $^{119}\text{Sn}$  (una soluzione isotopicamente arricchita di monobutilstagno (MBT), dibutilstagno (DBT) e tributilstagno (TBT)). Tale soluzione è utilizzata come standard interno di procedura e di quantificazione. Al fine di migliorare l'efficienza di estrazione della specie monosostituita, l'estrazione è eseguita con una soluzione di tropolone 0,03% in diclorometano. Dopo evaporazione e cambio di solvente (esano), i composti organostannici sono pentilati mediante reattivo di Grignard e la soluzione viene poi purificata su colonna di gel di silice. Infine, la soluzione concentrata è analizzata mediante GC-MS-SIM.

Per quando riguarda i campionatori passivi, l'estrazione degli analiti di interesse avviene o mediante dialisi con esano (SPMD) oppure mediante eluizione con una miscela diclorometano/metanolo (POCIS); in entrambi i casi la determinazione finale degli analiti è effettuata mediante GC-MS-SIM

### *Analisi dei metalli*

L'analisi dei metalli in acqua di mare viene effettuata utilizzando un ICP-MS PE Elan 6000 (Perkin Elmer, Inc., Shelton, USA). L'acquisizione viene effettuata per peak hopping con un dwell time pari a 50ms. La calibrazione delle masse indagate viene effettuata mediante 5 soluzioni standard a diverse concentrazioni degli analiti preparate diluendo soluzioni standard certificate monoelemento PE Pure Plus (Perkin Elmer, Inc, Shelton, USA) in HNO<sub>3</sub> 1%. Quale sistema di introduzione campione, viene utilizzato un analizzatore Flow Injection FIAS-400MS Perkin Elmer direttamente collegato all' ICP. La determinazione dei metalli viene effettuata nelle condizioni strumentali descritte in Paustian et al. 1998, Willie et al., 1998). Per la preconcentrazione e l'eliminazione della matrice salina viene utilizzata una colonna (50ul) impaccata con Toyopearl AF-Chelate-650M quale resina chelante equilibrata in tampone NH<sub>4</sub>OAc 0,5 M. La soluzione eluente è costituita da HNO<sub>3</sub> 1N. L'accuratezza del metodo viene assicurata effettuando l'analisi anche su due campioni di acqua di mare certificata per metalli in tracce (NRCC: SRMs CASS-3 e NASS-4).

### *Saggi ecotossicologici*

I campioni di acqua di mare sono stati utilizzati per i saggi ecotossicologici senza subire alcun trattamento. I campioni di sedimento sono stati trattati in modo da ottenere l'acqua interstiziale e gli eluati secondo le procedure riportate in ASTM (1994).

Sulle matrici acquose è stata effettuata la seguente batteria di saggi ecotossicologici: test di inibizione della bioluminescenza con il batterio *Vibrio fischeri*, test di inibizione della crescita algale con *Dunaliella tertiolecta* (UNI EN ISO 10253 modificato), test con il crostaceo *Artemia salina* (24h e 96h) (APAT\_IRSA), saggi di spermiotossicità ed embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Manzo et al. 2005). Sui sedimenti tal quali è stato condotto solo il test di contatto con *V. fischeri* (APAT\_IRSA).

Tutti i risultati sono stati espressi come EC50 e, laddove non era possibile, come massima percentuale di effetto rispetto al controllo.

Nelle località di Vlora e Shengjin sono stati prelevati esemplari di *P. lividus* i cui gameti sono stati utilizzati in laboratorio per valutare la capacità fecondante di echinoidi autoctoni. Brevemente, e' stato condotto un saggio di fecondazione sia in acqua di campionamento dei ricci che in acqua di mare artificiale.

Sulle matrici acquose ottenute dal trattamento dei sedimenti (eluati e acque interstiziali) sono stati effettuati tutti i test della batteria applicata alle acque di mare

### *L'analisi di rischio*

L'analisi di rischio ecologico è un processo iterativo che valuta la probabilità che effetti ecologici avversi possano avvenire o stiano avvenendo come risultato dell'esposizione ad uno o più agenti stressanti. Come descritto nelle *Guidelines for Ecological Risk Assessment* dell'U.S. EPA la valutazione del rischio avviene attraverso tre fasi fondamentali di formulazione del problema, analisi e caratterizzazione del rischio, che possono essere reiterate più volte al fine di ottenere una sempre maggiore accuratezza dei risultati. Nell'ambito di questo progetto l'ERA ha lo scopo di valutare il possibile stato di contaminazione del sito ed il grado di danneggiamento delle risorse naturali.

### *Risultati e considerazioni preliminari*



Le prime valutazioni dei questionari mostrano che le vernici utilizzate sono in particolare quelle prodotte dalle aziende Hempel e Veneziani. Inoltre, si evidenzia una grande attenzione degli utilizzatori rispetto al tema delle vernici: infatti, il passaggio dalle vernici a base TBT alle vernici con biocidi alternativi comporta un rimessaggio più frequente delle imbarcazioni, con un notevole danno economico per gli utilizzatori. Interessante, sarà lo studio della eventuale correlazione tra i biocidi presenti nelle vernici più utilizzate e i risultati analitici sui campioni prelevati. I campioni ambientali prelevati durante la campagna di Settembre in Puglia ed in Albania sono attualmente in fase di analisi. Il campionatore passivo esposto nel porto di Manfredonia per 21 giorni è stato ritirato agli inizi di ottobre 2012.

Sebbene anche l'analisi ecotossicologica sia ancora in fase di completamento, la batteria di saggi fin qui applicati alle diverse matrici ambientali campionate (Fig. 2), permette comunque di fare alcune considerazioni preliminari sullo stato ecotossicologico dei siti.

Le acque di mare campionate in Albania mostrano un effetto sempre al di sotto del 50% con quasi tutti i test applicati, solo il saggio algale ha permesso il calcolo dell'EC50 rivelandosi quindi il test maggiormente sensibile. Il batterio bioluminescente ha evidenziato un effetto ormetico con i campioni saggiati, e le maggiori percentuali di effetto sono sempre evidenziate con il test di fecondazione di *P. lividus*. *A. salina* (96h) risulta poco sensibile, rilevando valori spesso al di sotto al 20%. Non si riscontra una differenza con gli effetti prodotti dalle acque campionate alle banchine. I campioni risultati più tossici con il saggio algale applicato alle varie matrici acquose sono Shengjin e Vlora banchina con valori prossimi al 50% di campione mentre il sito risultato complessivamente meno tossico è Durazzo. Non si rileva in nessun caso una differenza significativa tra i risultati ottenuti con gli eluati e con le acque interstiziali dei sedimenti.

I saggi di fecondazione con gameti prelevati da popolazioni locali (Shengjin e Vlora) di *P. lividus* hanno evidenziato in entrambe i casi una diminuzione significativa rispetto alla fecondazione condotta in acqua di mare artificiale (ASTM).

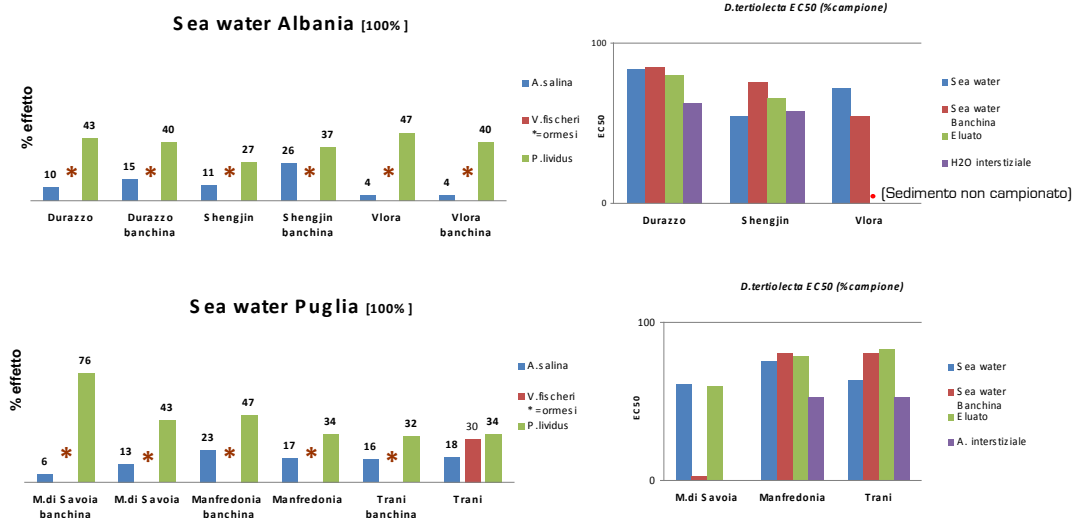


Figura 2. Campagna di Settembre 2012- Risultati preliminari dei saggi ecotossicologici

Le acque campionate nei porti della Puglia hanno evidenziato solo nel caso di M. di Savoia banchina un effetto superiore al 50% con quasi tutti i saggi applicati. Come per i campioni albanesi anche in questo caso il saggio algale ha permesso di calcolare un valore di EC50. *V. fisheri* ha evidenziato biostimolazione in quasi tutti i campioni tranne a Trani dove ha fatto registrare un debole effetto tossico. *A. salina* (96h) ha risposto debolmente, mentre il saggio di fecondazione con il riccio di mare ha sempre risposto con valori superiori al 30%. Il campione Margherita di Savoia banchina ha evidenziato il maggiore effetto di inibizione della crescita algale (96h), ed anche l'acqua di mare campionata al centro del porto e l'eluato del sedimento risultano più tossici rispetto agli altri siti di campionamento. Il campione che mostra complessivamente valori di EC50 più alti è Manfredonia, a Trani tra le matrici testate l'acqua di mare risulta avere il maggior effetto.

I porti sono luoghi presumibilmente molto inquinati in quanto caratterizzati da un intenso traffico nautico e da uno scarso ricambio d'acqua, con conseguente accumulo di contaminanti. Essi possono essere considerati dei serbatoi da cui i contaminanti si propagano nell'ambiente circostante e magari anche oltre, a grandi distanze, quando le correnti lo consentono. Pertanto, se in tali luoghi si rilevano livelli di contaminazione accettabili, anche l'ambiente circostante non viene considerato a rischio. Se, invece, le concentrazioni delle sostanze tossiche superano il livello di guardia, sarà necessario esaminare le aree limitrofe, con particolare riguardo a quelle di maggiore interesse per la flora e/o la fauna che le popolano.

Il primo punto dell'analisi di rischio consisterà nell'implementazione della fase di valutazione ed integrazione delle informazioni disponibili. I dati ottenuti dalle ricerche effettuate presso i principali rivenditori/utilizzatori di pitture presenti nella zona di interesse e i dati dalle campagne di prelievo nei tre porti localizzati in Puglia e Albania permetteranno la definizione della sorgente di contaminazione e alla identificazione dei principali agenti stressanti da sottoporre a valutazione. Ulteriori informazioni ottenute dalla caratterizzazione chimico-fisica e biologica di questi sistemi costieri consentirà l'identificazione di un recettore di interesse a livello di specie, popolazione o comunità.

Infine dall'integrazione dei dati di esposizione e di effetto si procederà alla stima del rischio secondo una tecnica di tipo probabilistico che tenga conto delle incertezze e della variabilità delle informazioni raccolte.

### ***Ringraziamenti***

Si ringrazia il MAE per il cofinanziamento alla realizzazione del primo anno del progetto CARISMA.

I campionamenti ambientali realizzati in Puglia, sono stati eseguiti grazie alla preziosa collaborazione delle Capitanerie di Porto di Manfredonia, Barletta, Margherita di Savoia e Trani. Inoltre, grazie alla disponibilità dell'Autorità Portuale di Manfredonia, è stato possibile sistemare, nel porto di sua competenza, per un periodo prolungato, un campionatore passivo. In Albania, è stato possibile effettuare l'intera campagna di monitoraggio per merito dei colleghi albanesi che si sono ampiamente impegnati nell'organizzazione logistica, oltre che nel supporto tecnico alla raccolta dei campioni.

### ***Bibliografia***

APAT IRSA-CNR (2003). Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida. 29/2003. Vol. Terzo. Sezione 8000: metodi ecotossicologici.  
ASTM (1994). Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments. ASTM E1525.: 22 pp.

Di Landa G., Parrella L., Avagliano S., Ansanelli G., Maiello E., Cremisini C., (2009). Assessment of the Potential Ecological Risks Posed by Antifouling Booster Biocides to the Marine Ecosystem of the Gulf of Napoli (Italy). *Water, Air, & Soil Pollution* 200: 305-321.

ISO 10253 (1995). Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. Pp. 8.

Manzo S., Buono S., Cremisini C. (2006) Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51: 61–68

Paustian M., Willie S. and McLaren J, Matrix elimination and determination of Trace Elements in Seawater by Flow Injection ICP-MS, Perkin Elmer bulletin

U.S. EPA (1992). Guidelines for Ecological Risk Assessment.

Willie S.N., Lidaand Y Mc Laren J.W (1998) Determination of Cu,Ni,Zn,Mn, Co,Pb,Cd and V in seawater Using Flow Injection ICP-MS, *J. of Atomic spectroscopy*, vol.19: 67-72

**Con il patrocinio di:**

**Regione Toscana; Provincia di Livorno; Comune di Livorno; Autorità Portuale di Livorno; ARPAT;  
CoNISMa; SIBM; SITE; AIOL; CNR-ISE; Università di Modena e Reggio Emilia;  
Università di Parma; Università di Pisa; Università Alma Mater Studiorum di Bologna;  
Università di Siena; Università Cà Foscari Venezia; Cricacq-Università di Napoli Federico II;  
Veneto Nanotech SCpA; ENEA.**

**Con il contributo di:**

**ECOTOX** LDS

*MICROBIOTESTS* Inc.



**MODERNWATER**