

SAGGI TOSSICOLOGICI DI LABORATORIO

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

ARPA LOMBARDIA-DIPARTIMENTO DI PAVIA

“Dalla Legge Merli al D.LGS. 152/99 e s.m.i. Disciplina degli Scarichi e Tutela dell’Ambiente”

27-28 gennaio 2003 -

Pavia, Collegio Ghislieri

Il Decreto Legislativo 152/99 e succ. mod. prevede per il monitoraggio e la classificazione delle acque superficiali l’impiego di saggi ecotossicologici per l’espletamento di analisi supplementari, non obbligatorie, da eseguire, a giudizio dell’autorità che effettua il monitoraggio, per un’analisi più approfondita delle cause di degrado del corpo idrico.

Per le analisi supplementari vengono segnalati, in via prioritaria, test di tossicità su campioni acquosi concentrati da effettuarsi con *Daphnia magna*, con batteri bioluminescenti, test di mutagenicità e di teratogenesi e test di crescita algale. Sui sedimenti, qualora sia necessaria una analisi più approfondita, si possono effettuare saggi su estratti di sedimento, su sedimento in toto e su acqua interstiziale.

Per quanto riguarda gli scarichi idrici, il D.Lgs prevede alla tabella 3 i valori limite per gli scarichi in acque superficiali ed in fognatura ed, alla tabella 4, i limiti per le acque reflue urbane ed industriali che recapitano sul suolo.

Il parametro 51 della tabella 3 ed il parametro 35 della tabella 4 prevedono il saggio di tossicità acuta a 24 ore con *Daphnia magna* individuando limiti diversi per gli scarichi in acque superficiali, su suolo ed in fognatura. Per gli scarichi in acque superficiali e su suolo un campione non è accettabile quando il numero degli organismi immobili risulta uguale o maggiore del 50% degli organismi utilizzati, per gli scarichi in fognatura il limite sale all’80%.

Il saggio di tossicità sulle acque di scarico è obbligatorio, l’organismo da utilizzare per il test è *Daphnia magna*, ma vengono suggeriti anche altri organismi, *Ceriodaphnia dubia*, *Selenastrum capricornutum*, batteri bioluminescenti o, per scarichi in acqua salata, *Artemia salina*.

Rimangono valide le procedure di controllo, campionamento ed analisi definite dalle normative in essere prima dell’entrata in vigore del decreto stesso, finché le metodiche non saranno aggiornate con apposito decreto ministeriale su proposta di ANPA.

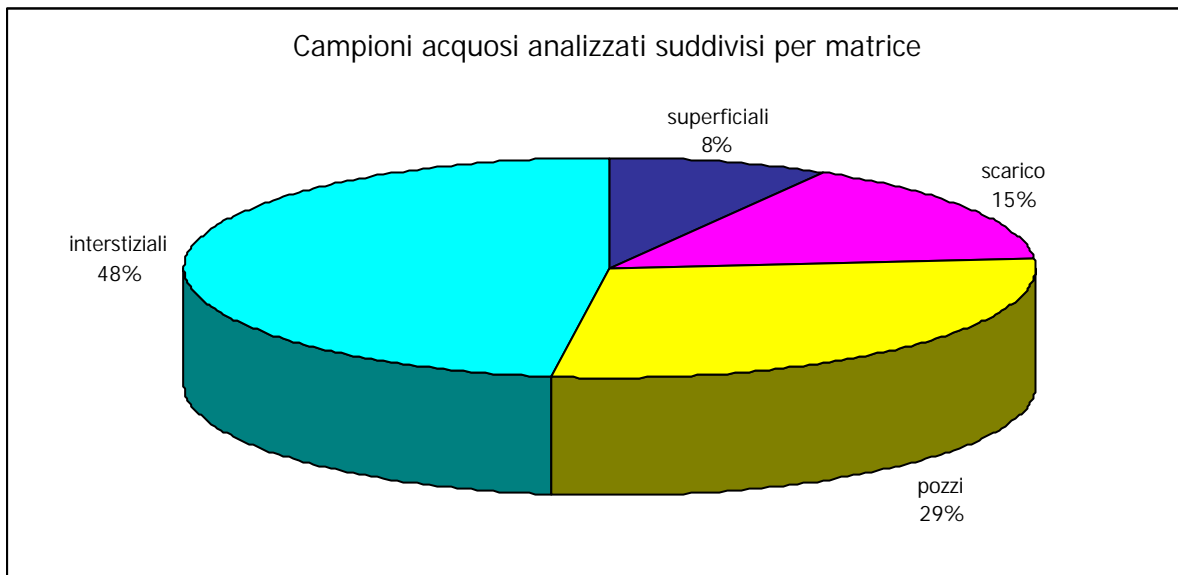
Nel laboratorio di Ecotossicologia del Dipartimento di Pavia già dal 1986 sono stati introdotti saggi di tossicità acuta con *Salmo gairdnerii* (*Oncorhynchus m.*) e *Carassius auratus*, organismi test previsti dalla L. 319/76 per l’analisi degli scarichi che dovevano rispettare la tabella A e la tabella C.

E’ stato poi introdotto l’allevamento di *Daphnia magna*, affiancando così un crostaceo al pesce nei test di tossicità. Nel 1994, con l’acquisto della strumentazione dedicata, viene introdotto il test con batterio bioluminescente, *Vibrio fischeri*, ed in seguito il test di tossicità cronica con *Ceriodaphnia dubia*, un test di genotossicità con *Vicia faba* (test del micronucleo) e più recentemente il test di tossicità cronica con un’alga, *Selenastrum capricornutum*.

I metodi di campionamento ed analisi sono quelli previsti dall’IRSA, da OECD e da protocolli internazionali e nazionali rivisti e standardizzati per l’applicazione dei test alle matrici oggetto di studio, nella realtà quotidiana del laboratorio.

Le matrici sottoposte a test sono: acque superficiali, acque sotterranee, sedimenti (tal quale e acqua interstiziale), scarichi idrici e fanghi destinati all’utilizzo agricolo.

Fig.1-Distribuzione percentuale dei campioni acquosi analizzati



RISULTATI

Acque superficiali

Sono stati sottoposti ai test i campioni costituiti dalle acque superficiali e dai sedimenti dei principali corsi d'acqua della Provincia di Pavia prima dell'immissione nel fiume Po. Quest'ultimo è stato campionato all'ingresso ed all'uscita del territorio provinciale; le stazioni degli affluenti sono state collocate a chiusura di bacino. Lo studio si riferisce ad un solo anno, 1998, e, poiché antecedente al Decreto Legislativo 152 e succ. mod, le stazioni non corrispondono a quelle previste per il monitoraggio e classificazione delle acque superficiali.

Le acque sottoposte a test non sono state concentrate.

Sono stati effettuati due campionamenti, uno invernale ed uno estivo.

Tab.1-Risultati del test di tossicità acuta sulle acque superficiali.

STAZIONI	<i>Daphnia magna</i> 24 h (% immobilizzazione)		<i>Vibrio fischeri</i> 15' (% di effetto)	
	INVERNO	ESTATE	INVERNO	ESTATE
Fiume Po Pieve	0	0	-9.4	-11.3
Fiume Sesia	0	0	-18.6	-14.3
Torrente Agogna	0	0	-16.6	-6.9
Torrente Erbognone	0	0	14.7	-7.6
Torrente Staffora	0	0	-0.4	-43.4
Torrente Terdoppio	0	0	-6.6	-55
Torrente Coppa	0	10	-	-12.7
Torrente Scuropasso	0	-	5	-
Fiume Ticino	0	0	-7	-64
Canale Naviglio	0	0	-10.5	-6.2
Torrente Versa	0	10	-15.8	-11.5

Fiume Olona Meridionale	0	0	-14.6	-15.4
Fiume Po Spessa	0	0	-1.8	-12.9

Azzurro: stimolazione > 20%

Tab. 2-Risultati del test di fitotossicità su sedimenti in toto. (Indice di Germinazione)

STAZIONI	<i>Lactuca sativa</i> 72 h (IG%)		<i>Cucumis sativus</i> 72 h (IG%)		<i>Lepidium sativum</i> 72 h (IG%)	
	INVERNO	ESTATE	INVERNO	ESTATE	INVERNO	ESTATE
Fiume Po Pieve	76.3	135.3	76.6	99.6	139.1	93.6
Fiume Sesia	108.8	57.8	118.4	72.7	125.0	77.8
Torrente Agogna	161.4	99.6	83.1	101.1	101.9	118.6
Torrente Erbognone	158	93.8	84.3	89.1	133.9	120.2
Torrente Staffora	109.5	145.0	124.4	124.0	143.7	94.0
Torrente Terdoppio	-	97.6	-	182.7		130.9
Torrente Coppa	124.2	75.8	83.8	102.3	83.6	105.4
Torrente Scuropasso	201.4	-	108.2		104.3	-
Fiume Ticino	132.4	56.5	124.0	120.6	171.4	65.5
Canale Naviglio	119.3	85.4	83.1	104.8	63.3	143.0
Torrente Versa	154.9	98.8	65.7	106.0	95.8	136.5
Fiume Olona Merid.	133.8	206.2	74.1	151.6	94.3	145.3
Fiume Po Spessa	73.4	84.7	76.6	34.1	146.2	65.4

Azzurro = >120 stimolazione

Verde = 80-120 nessun effetto

Giallo = 40-80 inibizione

Rosso = <40 marcata inibizione

Tab.3- Risultati del test di tossicità cronica su miscela di acqua superficiale e sedimento.

STAZIONI	<i>Ceriodaphnia dubia</i> 7 giorni					
	MORTALITA' %		ACCRESIMENTO (mm) (mediana)		FERTILITA' (n° piccoli) (mediana)	
	INVERNO	ESTATE	INVERNO	ESTATE	INVERNO	ESTATE
Controllo	0	0	0.98	0.95	13	24
Fiume Po Pieve	20	0	1.80 (+)	0.72 (-)	37 (+)	6 (-)
Fiume Sesia	10	80	0.86 (-)	0.71 (-)	17	3 (-)
Torrente Agogna	20	0	0.91	0.91 (-)	31 (+)	19 (-)
Torrente Erbognone	20	0	0.89	0.84 (-)	27 (+)	11 (-)
Torrente Staffora	50	20	0.78 (-)	0.81 (-)	5	17 (-)
Torrente Terdoppio	10	10	0.98	0.90 (-)	31 (+)	18 (-)
Torrente Coppa	30	20	0.80 (-)	0.86 (-)	11	6 (-)
Torrente Scuropasso	40	secca	0.88 (-)	secca	11	Secca
Fiume Ticino	10	10	0.92	0.95	27 (+)	18 (-)
Canale Naviglio	50	50	0.85	0.76 (-)	20 (+)	7 (-)
Torrente Versa	30	30	0.88 (-)	0.82 (-)	11	8 (-)
Fiume Olona Merid.	40	60	0.80 (-)	0.75 (-)	4 (-)	6 (-)
Fiume Po Spessa	20	10	0.82	0.85 (-)	13	10 (-)

(+) parametri superiori al controllo; Test di Wilcoxon p<0.05

(-) parametri inferiori al controllo; Test di Wilcoxon p<0.05

Mortalità: Verde <20% nessun effetto
 Giallo 20-60% tossicità
 Rosso 60-100% marcata tossicità

Accrescimento e fertilità: Azzurro =>120 stimolazione
 Verde = 80-120 nessun effetto
 Giallo = 40-80 inibizione

Tab. 4: Risultati del test di genotossicità sul sedimento in toto (test del micronucleo).

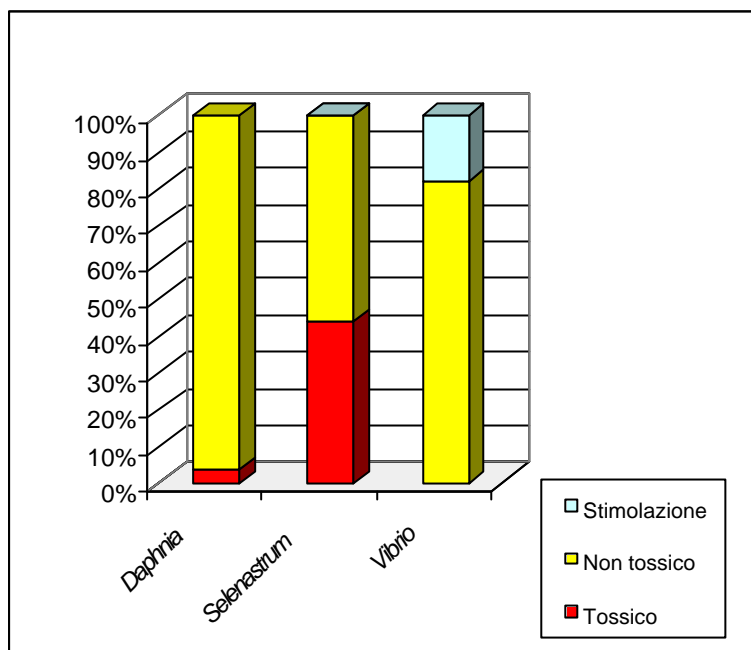
ESTATE	<i>Vicia faba</i> (96 h)									
	MITOSI (n°./1000 cell)					MICRONUCLEI (n°./1000 cell)				
	repliche				media	repliche				media
Controllo	100	98	90	96	96.0	1	0	2	1	1,0
Torrente Agogna	95	85	90	81	87.8	11	0	0	1	3.0
Torrente Staffora	95	87	91	105	94.5	4	1	2	0	1.8
Torrente Scuropasso	81	85	90	85	85.3	3	1	1	1	1.5
Fiume Ticino	92	89	96	89	91.5	0	0	0	1	0.3
Canale Naviglio	52	108	110	98	92.0	0	2	7	6	3.8
Fiume Olona Merid.	87	85	92		88.0	13	1	6		6.7

Accanto a rari fenomeni di fitotossicità e di tossicità cronica, appare preponderante la biostimolazione, fenomeno che internazionalmente è conosciuto come ormesi e che desta parecchio interesse; è noto infatti come attività deboli di uno stressore possano determinare un incremento del livello metabolico (Calabrese, 1994). Questo fenomeno, di per sé innocuo, è considerato da alcuni autori (Cairns e Niederlehner, 1995) un segnale di incipiente tossicità.

Acque sotterranee

Durante questi ultimi anni sono stati controllati i pozzi piezometrici delle discariche situate in Provincia di Pavia, attive ed in post-chiusura, affiancando all'analisi chimica prevista dalla legislazione vigente alcuni test di tossicità con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Selenastrum capricornutum*.

Figura 2-Acque di pozzi piezometrici: distribuzione percentuale degli effetti osservati su *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Selenastrum capricornutum*.



Scarichi idrici

Il D.Lgs 152/99 e succ.mod prevede alla tabella 3 dell'allegato5 i limiti di emissione in acque superficiali ed in fognatura . Per il parametro 51, saggio di tossicità acuta , il limite per cui un campione risulta non accettabile corrisponde ad una immobilizzazione degli organismi utilizzati uguale o maggiore al 50%,per lo scarico in rete fognaria tale limite risulta pari all'80%.Questi limiti corrispondono all'utilizzo di *Daphnia magna*. Il decreto prevede di poter effettuare il saggio anche con altri organismi, non è chiaro a questo punto se i limiti previsti per *D.magna* possano essere estesi anche agli altri organismi o se per questi ultimi si debba adottare ,in base a quanto previsto dalle metodiche di riferimento ed alla variabilità dei controlli, limiti che si discostano dal controllo del 20%.

La metodica IRSA prevede per il test di tossicità acuta con *Daphnia magna* l'impiego del campione diluito al 50%, per tutti gli altri organismi, la rispettiva metodica prevede il campione tal quale. I risultati dei test sulle acque di scarico degli impianti pubblici e privati testati nel corso del 2001 e del 2002 sono riassunti nelle tabelle.

Impianti pubblici

Tab. 5 Acque di scarico testate con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Selenastrum capricornutum* nel periodo 2001-2002.

	<i>Daphnia magna</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>
N° scarichi	110	70	102

Tab 6 Acque di scarico: distribuzione percentuale della tossicità osservata su *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Selenastrum capricornutum* del campione tal quale e diluito al 50% e adottando per entrambi sia i limiti previsti dalla metodica che quelli previsti dal D.Lgs.152/99.

	campione	<i>Daphnia magna</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>
Limite metodologia	Tal quale	10%	8,6 %	20%
Limite metodologia	50%	0%	0%	4%
Limite D.Lgs 152/99	Tal quale	4%	4,3%	1%
Limite D.Lgs 152/99	50%	0%	0%	1%

Impianti privati

Sono state testate n° 70 acque di scarico di impianti privati , 44 che recapitano in acque superficiali (63%) e 26 in fognatura (37%).

Tab7 Acque di scarico: distribuzione percentuale della tossicità osservata su *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Selenastrum capricornutum* del campione tal quale e diluito al 50% e adottando per entrambi sia i limiti previsti dalla metodica che quelli previsti dal D.Lgs.152/99

	campione	<i>Daphnia magna</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>
Limite metodologia	Tal quale	30%	45%	59%
Limite metodologia	50%	10%	28%	41%
Limite D.Lgs 152/99 (acque superficiali)	Tal quale	14%	15%	28%
Limite D.Lgs 152/99 (acque superficiali)	50%	4%	9%	28%
Limite D.Lgs 152/99 (fognatura)	Tal quale	38%	45%	4%
Limite D.Lgs 152/99 (fognatura)	50%	11%	27%	0%

A quei campioni che superano il limite previsto per legge e che vengono quindi considerati tossici, non si applica la sanzione di cui al Titolo V, il D.Lgs prevede l'obbligo di approfondimento delle indagini analitiche, la ricerca delle cause di tossicità e la loro rimozione.

Fanghi derivanti dal trattamento delle acque reflue

Sui fanghi, derivanti dai trattamenti di depurazione delle acque di scarico e destinati all'utilizzo agricolo sottoposti a controllo secondo quanto previsto dal Decreto Legislativo 99/92 ,alle analisi

chimiche ,è stato affiancato un test di fitotossicità per la verifica dell'eventuale presenza di tossicità permanente.

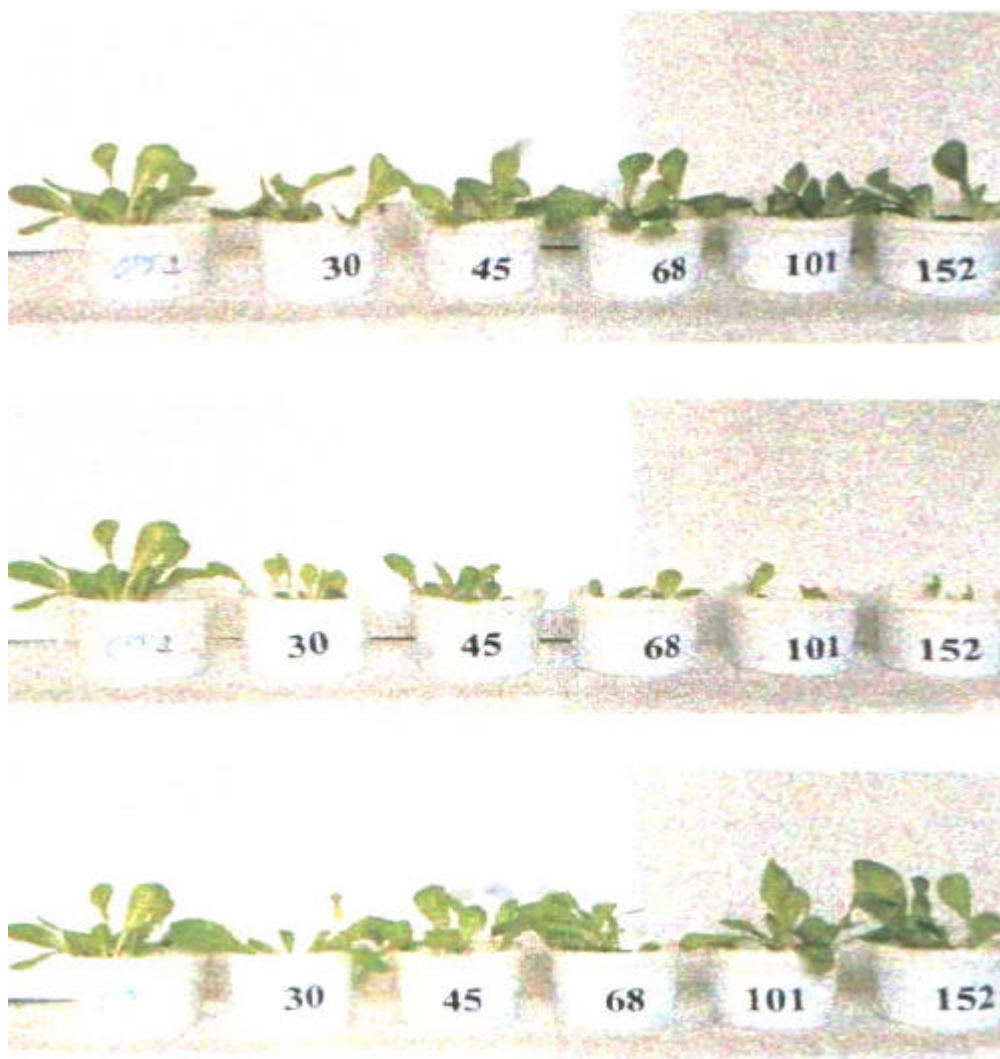
Il test di fitotossicità è un idoneo strumento atto a saggiare gli effetti di matrici complesse (fanghi,compost,ammendanti,reflui) liquide e solide ,sui vegetali. Il metodo prevede l'allevamento in laboratorio delle specie vegetali indicatrici su un substrato cui è stata aggiunta a diverse concentrazioni la matrice da saggiare. La biomassa secca prodotta viene confrontata con quella ottenuta da piante allevate sul solo substrato (controllo).

Per il test di vegetazione è stata scelta la lattuga (*Lactuca sativa* L.) in quanto garantisce riproducibilità delle risposte e sensibilità ai tossici di riferimento Il test viene effettuato su campioni casuali raccolti durante la fase di spandimento su suolo agricolo.

Il test è condotto in accordo al metodo DIFCA (Astori,Genevini,1998). Per ogni prodotto sono impiegate cinque diverse concentrazioni in quattro repliche e tre piantine di lattuga per replica. Dopo 21 giorni , in serra a temperatura ed umidità controllate, vengono recuperate le piantine, essiccate e pesate. I risultati sono espressi come Indice di Crescita (media del peso secco per ciascuna dose/ media del peso secco del controllo).

Nel corso del 2002 sono stati testati 20 fanghi da destinarsi all'uso agricolo.

Il 55% dei campioni esaminati presenta un Indice di crescita inferiore al controllo, il 45% un Indice di crescita uguale al controllo; non sono stati riscontrati esempi di spiccata stimolazione della crescita vegetale né di spiccata tossicità.



Bibliografia

- Baudo R., Mountau H. 1985 Riflessioni sulle "aree problematiche" in ecotossicologia *Acqua-Aria* 4: 331-339.
- Burton G.A. 1991 Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10 : 1585-1627.
- Cairns J. Niederlehner B.R. 1995 Predictive ecotoxicology. In Casarett L. and Doull's J. (Eds.). *Toxicology*. Mc-Graw-Hill, New York, USA: 13-33.
- Calabrese E.J. 1994 Biological effects of low level exposures. Lewis Publishers, Boca Raton, USA: 302.
- Dell'Orto N., Ciccotelli M. Cantelli D. Camatini M. 1997 Sviluppo di un sistema di biomonitoraggio a tre componenti per la valutazione della qualità delle acque. *Acqua-Aria* 5:103-107.
- Filipic M., 1995 Mutagenicity and toxicity of water extracts from Sora river area. *Mutation Research*, 342:1-8.
- IRSA 1993 Saggi di tossicità con *Daphnia magna*- Atti della giornata di studio organizzata dall'Istituto Superiore per la Ricerca sulle Acque- Quaderno:1.1-9.11.
- IRSA, 1983: Analisi della fitotossicità della sostanza organica in decomposizione mediante bioassaggio *Lepidium sativum*.- *Metodi Analitici per i Fanghi: Parametri biochimici e biologici*- Quaderno IRSA, 64:8.1-8.3.
- IRSA, 1996: Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti. *Notiziario dei metodi analitici*.ISSN:0392-1425.
- Pasini MA., Gazzola M., Secondi A., Villa M. Monitoraggio di corpi idrici superficiali mediante test ecotossicologici multispecie su acque e sedimenti. *Atti del Convegno nazionale di Ecotossicologia*. Torino, 2000. Pp. 78-83.
- Pasini M.A. Garavani M.:Valutazione degli effetti tossici e genotossici indotti da acque e sedimenti di corsi d'acqua superficiale su apici radicali di *Vicia faba*-Atti Seminario di Studi" Dalla tossicologia alla Ecotossicologia", Pordenone 16-17 settembre 1994.
- Rampa P.L., Ocelli C., Ferraro M., Gaffodio A.M., Fassina E., Radium P. Test di inibizione della crescita algale su matrici acquose: metodo miniaturizzato. *Atti del Convegno nazionale di Ecotossicologia*. Torino, 2000. Pp. 49- 52.
- Viganò L. 2000 Assesment of the toxicity of River Po sediments with *Ceriodaphnia dubia* *Aquatic Toxicology*. 47:191-202.
- Vigano' L.,1998: Test di tossicità cronica (7giorni) con *Ceriodaphnia dubia*.-*Notiz.Metodi Anal.Acque* maggio 1998: 8-13.