

## Ecotossicologia e qualità delle acque

Silvia MARCHINI

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - Sono presentati alcuni concetti basilari dell'ecotossicologia, con riferimenti specifici all'ambiente acquatico. Relativamente all'esposizione ai contaminanti, sono illustrate e discusse le principali proprietà di una sostanza che determinano la sua presenza nei vari comparti e matrici ambientali. Viene sottolineata l'importanza del potenziale di bioaccumulo, responsabile del raggiungimento nel biota di concentrazioni della sostanza anche molto superiori a quelle nell'ambiente esterno. Risalto viene dato ai processi di biodisponibilità, che modulano la frazione di sostanza disponibile per l'assunzione da parte degli organismi. Gli effetti tossici sul biota sono illustrati ai diversi livelli di organizzazione biologica a cui possono essere osservati. E' discusso infine il ruolo dell'indagine ecotossicologica nell'ambito di un approccio integrato alla valutazione della qualità delle acque, assieme alle specifiche informazioni fornite.

*Parole chiave:* ecotossicologia, esposizione, bioaccumulo, biodisponibilità, effetti tossici, qualità delle acque.

**Summary** (*Ecotoxicology and water quality*). - Fundamental concepts of ecotoxicology are presented, making specific reference to the aquatic environment. As far as exposure to contaminants is concerned, the main properties of a substance that determine its presence in the various environmental compartments and matrices are illustrated and discussed. The crucial importance of the bioaccumulation potential is stressed, as it can be responsible for the level of substance reached in the biota, which can be much higher than that present in the external environment. It is also underlined the importance of bioavailability processes, which tune the chemical fraction available for absorption by organisms. The toxic effects on biota are illustrated at the different levels of biological organization they can be observed. Last, the role of the ecotoxicological investigation within an integrated approach to the water quality assessment is discussed along with the specific information provided.

*Key words:* ecotoxicology, exposure, bioaccumulation, bioavailability, toxic effects, water quality.

### Introduzione

Dal 1969, anno in cui il termine ecotossicologia fu coniato da un comitato dell'International Council of Scientific Unions [1], molte sono state le definizioni attribuite a questa disciplina, che hanno posto di volta in volta l'accento sulla sua componente ecologica o tossicologica (per una rassegna vedi Newman [2]). Tra queste, la definizione data da Forbes and Forbes [3] individua chiaramente le aree di interesse: "Il campo di studio che integra gli effetti ecologici e tossicologici degli inquinanti chimici su popolazioni, comunità ed ecosistemi con il loro destino nell'ambiente (trasporto, trasformazione, e degradazione)".

In questa definizione viene sottolineata l'importanza del destino delle sostanze e dei loro effetti sugli ecosistemi quali componenti chiave della funzione ecosistemica e viene incluso il concetto fondamentale che gli effetti tossicologici possono essere sia diretti (fisiologici, per esempio effetti su una specie

preda) che indiretti (ecologici, per esempio effetti sulla competizione nella specie predatrice). Di fatto l'ecotossicologia è una disciplina multidisciplinare che integra i campi di indagine della chimica (del destino delle sostanze nell'ambiente), della tossicologia ambientale (che si occupa della valutazione degli effetti a diversi livelli di integrazione biologica), e della ecologia (che fornisce indicazioni sui processi che regolano la struttura e funzione degli ecosistemi e le interazioni tra la componente biotica ed abiotica). Un'ulteriore importante componente che caratterizza l'ecotossicologia è quella previsionale, che si avvale di modelli matematici in grado di fornire previsioni sia sul destino ambientale delle sostanze, sia sui loro effetti sugli organismi esposti e sui sistemi ecologici.

Nel linguaggio comune è invalso l'uso di utilizzare il termine ecotossicologia per far riferimento allo studio degli effetti di inquinanti sulle popolazioni e comunità animali naturali (organismi acquatici, uccelli, invertebrati terrestri, ecc.), in contrapposizione alla

tossicologia che è interessata agli effetti sull'uomo ed utilizza per l'estrapolazione modelli animali quali ratto, topo, coniglio. Tant'è che nelle procedure di valutazione del rischio (per esempio delle sostanze chimiche e prodotti fitosanitari) se ne fa menzione, rispettivamente, come studi ecotossicologici e studi tossicologici, salvo rimandare agli studi sui mammiferi di laboratorio per effettuare previsioni degli effetti sulle popolazioni di mammiferi selvatici [4, 5].

A questo riguardo è interessante notare che la definizione originale di questa scienza (data da Truhaut nel 1977 [1]) includeva esplicitamente anche gli effetti sull'uomo, concetto ripreso recentemente da Newman, che estende il contesto ecosistemico alla biosfera. [2].

È importante sottolineare che, in ogni caso, la salute dell'uomo è strettamente dipendente da quella dell'ambiente, al punto che elevati livelli di degradazione dei sistemi naturali possono comprometterne addirittura l'esistenza per l'impossibilità di utilizzare le risorse. Oggetto dell'indagine ecotossicologica sono le sostanze introdotte nell'ambiente per opera dell'uomo quali i contaminanti, gli inquinanti e gli xenobioti. Tali termini hanno un'accezione specifica che li distingue. Di seguito vengono date alcune definizioni con il corrispondente termine inglese che ricorre nella letteratura internazionale:

- contaminante (*contaminant*): una sostanza rilasciata dalle attività dell'uomo [6];
- contaminazione (*contamination*): la conseguenza di una azione umana capace di modificare le proprietà delle condizioni o la disponibilità e la qualità delle risorse in un determinato intervallo di spazio e di tempo [7]. Nel caso di un contaminante l'effetto nocivo non è implicito ma può manifestarsi;
- inquinante (*pollutant*): una sostanza che è presente nell'ambiente, almeno in parte, quale risultato delle attività umane e che ha un effetto deleterio sugli organismi viventi [6];
- inquinamento (*pollution*): quando si ha un danno misurabile a carico di un sistema biologico, allora la contaminazione ambientale diviene inquinamento [7];
- xenobiota (*xenobiotic*): una sostanza estranea o un materiale che non è prodotto in natura e normalmente non è considerato un componente di uno specifico sistema biologico. Questo termine viene in genere applicato alle sostanze chimiche di sintesi [8].

In ogni caso in letteratura si riscontra una certa ambiguità nell'uso dei termini "contaminazione" e "inquinamento", e sarebbe auspicabile l'adozione di una loro definizione univoca.

Scopo della ricerca ecotossicologica è di fornire informazioni e strumenti per analisi, misura, predizione e controllo delle sostanze nell'ambiente, che trovano applicazione pratica nella fissazione dei livelli massimi di concentrazione che per un dato contaminante non devono essere superati nell'ambiente, nelle procedure

di valutazione del rischio ambientale, e nelle attività di monitoraggio, valutazione e gestione della qualità ambientale.

### Fattori determinanti l'esposizione a contaminanti

Le sostanze chimiche di origine antropogenica possono entrare nell'ambiente acquatico attraverso fonti puntiformi, quali uno scarico industriale o civile, o da fonti diffuse, quali il dilavamento e l'erosione di terreni agricoli trattati con pesticidi o la deriva aerea durante l'applicazione di pesticidi con erogatori spray. Una volta immesse in un corpo idrico, il comportamento, la distribuzione, il destino, la degradazione delle sostanze chimiche nell'ambiente dipenderanno sia dalle loro specifiche caratteristiche fisico-chimiche che da quelle del sistema acqua/sedimento ricevente, che determineranno in ultimo le concentrazioni di sostanza cui i diversi organismi saranno esposti. Il trasporto di contaminanti in forma disciolta darà luogo a diluizione e diffusione delle sostanze nella colonna d'acqua, mentre l'adsorbimento su particolato farà sì che esse si leghino ai solidi sospesi ed alla frazione solida dei sedimenti. Questi ultimi, nel caso di contaminanti persistenti, andranno a costituire nel tempo, serbatoi di accumulo di queste sostanze ed al tempo stesso fonti durevoli di emissione nel corpo idrico. Il destino di un contaminante può essere, con buona approssimazione, previsto in base alle sue costanti di ripartizione, che ne definiscono la distribuzione tra i vari comparti ambientali, e ai processi di trasformazione e degradazione biotica ed abiotica a cui sarà sottoposto.

Il coefficiente di ripartizione carbonio organico/acqua ( $K_{oc}$ ) descrive l'affinità delle sostanze organiche non polari verso il suolo, sedimenti e particolato e la tendenza a concentrarsi in questi comparti per adsorbimento piuttosto che rimanere in fase acquosa (rispetto al coefficiente di adsorbimento il  $K_{oc}$  è normalizzato per il contenuto in C organico del suolo/sedimento). Esempio classico è quello degli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) che sono presenti nei sedimenti a concentrazioni migliaia di volte superiori di quelle nell'acqua. Per le sostanze polari (ionizzate) l'adsorbimento è regolato dal pH e dalla capacità di scambio ionico e non dal  $K_{oc}$ . I metalli si trovano adsorbiti a (o complessati con) componenti dei sedimenti, come particelle di argilla, rivestimento di ossidi metallici sulle particelle argillose e materia organica (disciolta o particolata).

Il coefficiente di ripartizione aria/acqua ( $K_{aw}$ ) esprime il rapporto, all'equilibrio, tra la concentrazione della sostanza in aria e in acqua descrivendo così la tendenza di una sostanza a volatilizzare, cioè a migrare dal comparto acqua ed entrare nel comparto aria. Esso si calcola direttamente dalla costante di Henry (H).

Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ( $K_{ow}$  o P) è un descrittore di lipofilità, cioè della tendenza delle sostanze organiche neutre a ripartirsi nella fase lipidica. Questa proprietà è di fondamentale importanza per gli effetti degli inquinanti sul biota, perché da essa dipende la capacità delle sostanze chimiche di attraversare le membrane biologiche, produrre effetti tossici e concentrarsi negli organismi, dando luogo a fenomeni di bioaccumulo e di magnificazione lungo la catena alimentare. Il  $K_{ow}$  non è applicabile nel caso di metalli, sostanze polari o ionizzate e tensioattivi.

Una rassegna dei metodi per stimare le proprietà delle sostanze attraverso l'uso dei fattori di ripartizione è presentata in Boethling and Mackay [9].

### Bioaccumulo

Il bioaccumulo è il risultato dell'assunzione di contaminanti presenti nell'acqua e nel cibo e della loro ritenzione all'interno degli organismi. Il bioaccumulo di una sostanza è espressione della sua tendenza a ripartirsi nel biota piuttosto che in altre matrici ambientali (come acqua o materia organica) e fa sì che essa, anche se presente nell'ambiente a basse dosi, possa raggiungere la concentrazione critica negli organi bersaglio. Alcune sostanze tendono ad accumularsi in particolari siti/tessuti all'interno dell'organismo creando veri e propri depositi di tossico. Nel caso di sostanze lipofile la ripartizione tra acqua e grasso del biota è riconosciuto come principale meccanismo di accumulo nel tessuto adiposo, come è noto per i bifenili policlorurati (PCB) e i pesticidi organoclorurati (per esempio il DDT). Altro esempio di sostanza accumulabile è il piombo che va a sostituire il calcio nelle ossa. Attraverso il processo di accumulo la sostanza viene in parte sottratta alla distribuzione nel corpo, diminuendo la concentrazione al sito/organo bersaglio e quindi i potenziali effetti tossici, ma allo stesso tempo viene sottratta anche ai processi di eliminazione. Ne risulta una lunga permanenza di alte concentrazioni delle sostanze nell'organismo che nel tempo possono essere lentamente rilasciate dai siti di deposito. Durante periodi di *stress* (digiuno, gravidanza), la sostanza può essere smobilizzata dal tessuto adiposo e raggiungere concentrazioni tossiche nel sangue. Il rischio rappresentato dalle sostanze accumulabili è pertanto che l'organismo continua ad essere esposto dall'interno, anche dopo che l'esposizione esterna è cessata [10]. Il bioaccumulo non è quindi un rischio di per sé ma può portare ad effetti tossici che possono essere diretti, indiretti o ritardati, e pertanto è un fenomeno fondamentale da considerare nelle procedure di valutazione del rischio di tutte le sostanze di interesse ambientale [4, 5]. Il potenziale di bioaccumulo è pertanto una proprietà molto importante delle sostanze chimiche, specie di quelle persistenti. Il

bioaccumulo, la persistenza e la tossicità sono proprietà intrinseche di una sostanza e come tali utilizzate nel processo di identificazione della pericolosità (*hazard identification*) e nel sistema internazionale di classificazione della pericolosità (*hazard classification*) sviluppato dall'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) [11].

La via più semplice per stimare la capacità di bioaccumulo di una sostanza da parte del biota è in genere quella di misurare sperimentalmente in laboratorio, su pesci o invertebrati, il fattore di bioconcentrazione (BCF, rapporto tra concentrazione della sostanza nell'animale e concentrazione in acqua, in condizioni di equilibrio) [12, 13]. In altre parole la bioconcentrazione esprime il bioaccumulo diretto dall'acqua (escludendo altre vie di assunzione), attraverso un meccanismo di diffusione passiva dagli organi respiratori nel sistema circolatorio e di deposito nei tessuti. Un analogo modello è il fattore di bioaccumulo (BAF, rapporto tra concentrazione nell'animale e concentrazione nel mezzo di esposizione), che assume che il tossico sia assunto dall'acqua e dalle fasi solide (cibo, sedimenti, particolato in sospensione) e in genere si misura in animali prelevati dal loro ambiente naturale. Il termine bioaccumulo è di carattere generale e spesso è utilizzato quando le fonti di assunzione della sostanza non sono chiaramente definite. Per riferirsi in maniera specifica all'accumulo dai sedimenti è utilizzato il fattore di accumulo biota-sedimenti (BSAF, rapporto tra concentrazione nei tessuti dell'organismo, normalizzata per il contenuto lipidico nel tessuto, e la concentrazione nel sedimento, normalizzata per il carbonio organico nel sedimento). Il BSAF è un fattore empirico, sito- e specie-specifico perché dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del sedimento e della sostanza organica e dal contenuto lipidico dell'organismo [14]. Esso ha il vantaggio, a differenza del BCF, di non assumere l'equilibrio tra sedimento e organismo, ed è utilizzato per stimare il potenziale accumulo di composti organici neutri (TBP, *theoretical bioaccumulation potential*) da parte di organismi bentonici [10].

La variabilità osservata nelle predizioni empiriche del bioaccumulo (valori di BSAF) indica la grande influenza che i processi che regolano la biodisponibilità hanno sull'esposizione [10].

In mancanza di dati sperimentali, i fattori di bioconcentrazione/accumulo possono essere stimati attraverso modelli matematici che utilizzano il  $K_{ow}$  [15, 16]. È stato dimostrato che per i metalli i suddetti fattori non sono buoni predittori di bioaccumulo e il loro uso nella identificazione di pericolosità (*hazard identification*) e classificazione di una sostanza non è appropriato, in quanto non sono indipendenti dall'esposizione e portano a valutazioni di pericolosità (alto BCF) là dove i dati di tossicità indicano assenza di pericolo (bassa concentrazione di esposizione) [17].

Ulteriore complessità (e fattore di rischio) deriva dal fatto che i contaminanti possono essere accumulati in maniera diversa nei diversi organismi e trasferiti, attraverso la catena alimentare, da prede contaminate ai livelli trofici più alti fino ai predatori apicali e all'uomo [18]. Si parla di avvelenamento secondario quando si verifica esposizione indiretta alla sostanza, per esempio nel caso di uccelli o mammiferi che si nutrono di pesci contaminati, e di biomagnificazione qualora la sostanza si accumuli in misura sempre maggiore lungo la catena trofica. La valutazione del potenziale di biomagnificazione è specialmente importante per le sostanze persistenti ed accumulabili e viene espresso attraverso il calcolo del fattore di biomagnificazione (BMF, rapporto tra concentrazione nel predatore e quella nella preda). Modelli dettagliati di catene alimentari sono presentati in Carbonell *et al.* [19].

#### *Biodisponibilità*

L'assunzione che tutta la sostanza presente in una matrice (concentrazione totale misurata dopo estrazione) sia biodisponibile conduce a misure di esposizione che non sono buoni predittori del bioaccumulo e della tossicità. Dall'analisi dei dati di tossicità per esempio non è infrequente osservare che la variabilità tra le specie è minore della variabilità entro la stessa specie e che la tossicità in laboratorio è molto più alta di quella misurata sul campo. Facendo riferimento ai sedimenti si parla spesso di comparto dove i contaminanti vengono sequestrati, infatti si possono raggiungere alte concentrazioni di tossico senza che si producano per questo degli effetti negli organismi che vi abitano [10]. La frazione di tossico considerata biodisponibile è per lo più quella disciolta nella fase acquosa (acqua della colonna o acqua interstiziale dei sedimenti) o quella presente all'interno dell'organismo, mentre quella legata al particolato è in genere considerata non disponibile.

Il fenomeno della biodisponibilità è trasversale alla valutazione dell'esposizione degli organismi ai contaminanti e a quella dei loro effetti. I processi di biodisponibilità si sovrappongono a molte delle vie di esposizione e perciò sono parte integrante della sua valutazione. Si prenderanno in considerazione la frazione assorbibile dalle specie rappresentative/chave per contatto diretto degli organismi con il sedimento (attraverso ingestione di particelle solide e detriti organici, respirazione nell'acqua interstiziale, assorbimento per contatto esterno della superficie corporea), la frazione di contaminante che viene rilasciata dai sedimenti nella colonna d'acqua a cui sono esposti gli organismi pelagici, quella disponibile per il trasferimento lungo la catena alimentare (di sostanze accumulabili quali PCB e mercurio), e la potenziale intossicazione secondaria di organismi predatori che si cibano di prede che hanno accumulato il contaminante [10].

A livello di effetti tossici i processi di biodisponibilità consentono di spiegare/predire le diverse risposte di organismi esposti alla stessa concentrazione di contaminante ma presente in mezzi o matrici con diverse caratteristiche chimico-fisiche. Una maniera per misurare la biodisponibilità è quella di condurre test di tossicità o di bioaccumulo. Condizione necessaria affinché si possano produrre effetti tossici sul biota è che la sostanza risulti biodisponibile, cioè presente in uno stato in cui può essere assorbita dall'organismo. La capacità di una sostanza di creare disfunzioni nel sistema dipenderà infine dalla sua tossicità intrinseca (e/o di quella dei suoi metaboliti) o dalle potenzialità di alterare gli equilibri del sistema.

Un gran numero di variabili caratterizzanti la matrice dell'effluente, dell'acqua ricevente e dei sedimenti può giocare un ruolo importante nel determinare la speciazione della sostanza, la sua presenza in una matrice piuttosto che in un'altra (cioè la frazione disciolta in acqua e la frazione adsorbita ai solidi), e, in ultima analisi, la sua biodisponibilità nei confronti degli organismi sia planctonici che bentonici, cioè il livello di concentrazione di una sostanza a cui un organismo è effettivamente esposto. Per matrici solide quali i sedimenti, ad esempio, la biodisponibilità e tossicità di contaminanti ad essi associati può essere influenzata da vari fattori fisici, chimici e biologici [20]:

- sedimentazione, risospensione, diffusione;
- caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua, dell'acqua interstiziale e del particolato (temperatura, pH, potenziale redox, durezza, alcalinità, contenuto in carbonio organico e materia organica, carbonio organico disciolto, composizione dei sedimenti, capacità di scambio cationico);
- presenza di solfuri acidi volatili (AVS), metalli competitori, ligandi inorganici, agenti chelanti organici);
- tipo di organismo, dimensioni, comportamento alimentare dei vari gruppi tassonomici, attività che creano turbolenza;
- via di esposizione (attraverso l'alimentazione, la respirazione, il contatto della superficie corporea).

Nel caso di sedimenti raccolti sul campo ed utilizzati in test di laboratorio, tutte le procedure impiegate nella raccolta, conservazione e manipolazione del campione possono alterarne l'integrità e rappresentare ulteriori fattori modulanti la biodisponibilità dei contaminanti presenti.

La comprensione di questi fattori è essenziale per pianificare studi di tossicità, per l'interpretazione dei risultati e per la classificazione/gestione di siti contaminati.

Per incorporare i processi di biodisponibilità nella valutazione dell'esposizione si utilizzano comunemente fattori di bioconcentrazione o bioaccumulo. Recentemente

sono stati sviluppati modelli di biodisponibilità capaci di predire la tossicità acuta e cronica su pesci, invertebrati ed alghe [21].

### Effetti tossici dei contaminanti

Per poter causare effetti sul biota una sostanza tossica deve poter raggiungere all'interno dell'organismo (per diffusione passiva o trasporto attivo) una certa concentrazione critica. Dalla sua capacità di essere assunto dagli organismi, distribuirsi nell'organismo, di accumularsi nei tessuti, di essere sottoposto a processi di biotrasformazione e di essere eliminato, dipenderà la dose del tossico al sito d'azione. Tale sito può essere una molecola recettore (per esempio una proteina della membrana cellulare, enzima, DNA-RNA) o, come nel caso delle sostanze che agiscono con meccanismo d'azione aspecifico, è la membrana cellulare ad essere alterata nella sua struttura, con conseguente disturbo della sua funzione.

All'interazione di una sostanza tossica col recettore seguiranno effetti sui sistemi biologici, che possono essere valutati a diversi livelli di organizzazione.

#### Cellula

L'importanza di una valutazione tossicologica a livello cellulare risiede nel fatto che idealmente una alterazione a questo livello scatena una serie di eventi tossici che culminano in una alterazione a livello di ecosistema. Di fatto, le relazioni tra gli effetti ai diversi livelli di organizzazione biologica non è diretta e inoltre non tutte le alterazioni cellulari hanno valenza di danno, alcune sono protettive e portano ad un adattamento al tossico [22]. L'effetto si manifesterà a livelli superiori solo se i processi di regolazione e modificazione cellulare saranno tali che i meccanismi tossici superino i processi adattativi e quindi la capacità di risposta protettiva (che porta a fenomeni di compensazione e tolleranza).

Gli effetti che si valutano a livello cellulare sono essenzialmente alterazioni di tipo biochimico. L'induzione delle monoossigenasi dipendenti dal citocromo P450 (che sono coinvolte nel metabolismo degli xenobioti) può essere utilizzata come biomarcatore della contaminazione ambientale e servire come sistema di allarme precoce per l'esposizione a classi di sostanze (PCBs, PAHs). [23]. A livello del nucleo le sostanze chimiche possono manifestare la loro azione genotossica legandosi alle molecole di DNA (principalmente alle basi nucleotidiche) dando luogo alla formazione di addotti al DNA, che causano problemi nella duplicazione e *strand breaks*. La misura degli addotti è utilizzata per monitorare l'esposizione dei pesci a sostanze cancerogene sia in laboratorio

che sul campo [24]. Una risposta tossicologica più complessa che si può misurare nella cellula è l'inibizione del sistema immunologico, che può avere un impatto significativo sulle popolazioni naturali [25]. Le sostanze tossiche possono ad esempio alterare la fagocitosi dei macrofagi e quindi la loro risposta ai batteri, sia come attivazione che come soppressione immunitaria.

Un'altra importante risposta cellulare è la sintesi delle cosiddette "proteine *stress*", che si verifica rapidamente in seguito all'esposizione a diversi agenti disturbanti ambientali tra cui il calore, virus, l'esposizione a contaminanti chimici organici e metalli pesanti. Le "proteine *stress*" conferiscono resistenza e tolleranza agli organismi e pertanto sono di rilevanza ambientale, come dimostrato in studi *in situ* con specie acquatiche [26]. Il loro potenziale uso come strumento diagnostico tossicologico risiede nel fatto che il tipo di induzione è diverso a seconda del tipo di agente disturbante.

#### Individuo

A livello del singolo organismo si considerano gli *endpoint* ecotossicologici più comunemente utilizzati che misurano effetti sulla fisiologia, morfologia/anatomia, comportamento, quali mortalità, inibizione del movimento, della crescita e della riproduzione, alterazioni istologiche o lesioni di organi, effetti teratogeni, alterazioni comportamentali (della fototassi, nuoto, corteggiamento). Salve poche eccezioni, le linee guida per la conduzione dei test tossicologici fanno riferimento all'utilizzo di un numero limitato di individui appartenenti ad una singola specie, aventi caratteristiche uniformi (età, peso, dimensioni, ecc.) al fine di ridurre la variabilità degli effetti osservati e garantire la riproducibilità dei risultati [27].

Nella valutazione di rischio per l'ecosistema, alterazioni osservate in *endpoint* direttamente correlati con fattori chiave delle dinamiche di popolazione, quali per esempio sopravvivenza e riproduzione, sono considerate di maggior rilevanza ecotossicologica di altri, quali le variazioni in un parametro biochimico, il cui significato è incerto.

#### Popolazione

A questo livello si utilizzano indici di *performance* quali la densità di popolazione, la sua struttura per classi di età, il tasso intrinseco di crescita ( $r$ ) ed il tasso intrinseco del *turnover* della biomassa ( $P/B$ ). Per esempio, poiché gli stadi giovanili sono in genere più sensibili ad un insulto chimico, una variazione nella distribuzione delle classi di età verso una popolazione più vecchia può indicare una situazione di *stress*, anche se in natura fluttuazioni nella dimensione della

popolazione e struttura di età sono fisiologiche e sono anche influenzate da interazioni preda-predatore [28]. Il tasso  $r$  dipende dalle caratteristiche degli organismi (tasso di nascita e mortalità, età alla riproduzione e numero di eventi riproduttivi) mentre il tasso  $P/B$  misura la produttività della popolazione, cioè il tasso a cui viene prodotta la biomassa, in relazione alla biomassa presente [29]. La produzione di biomassa può essere un parametro ecologicamente più rilevante della produzione di un certo numero di individui, specie dal punto di vista del suo ruolo nella catene trofiche.

I parametri di popolazione non sono necessariamente più sensibili di quelli relativi all'organismo singolo, ma sono più rilevanti da un punto di vista ecologico ed integrano in una sola misura i diversi effetti prodotti nel ciclo vitale. Tra gli studi di popolazione in laboratorio, il test di tossicità sulle alghe unicellulari è quello più semplice ed utilizzato.

#### *Comunità*

Agli effetti diretti sugli individui di una popolazione faranno seguito effetti indiretti sulla comunità da attribuire ad alterate interazioni tra specie (competizione, mutualismo, relazioni preda-predatore), che conducono ad alterazioni della sua struttura. Salendo a livello di comunità, un comune parametro utilizzato per indicare la salute dell'ecosistema è la sua struttura, intesa come diversità e distribuzione delle specie presenti, che viene misurata sia semplicemente come numero delle specie presenti che facendo ricorso alla teoria dell'informazione. C'è da rilevare che comunque non sempre un sistema disturbato risponde con una diminuzione della diversità, come è stato visto in esperimenti con microcosmi, e che la diversità può essere indice di longevità e dimensioni dell'habitat piuttosto che delle proprietà inerenti dell'ecosistema [28]. Ad alterazioni della struttura della comunità possono far seguito effetti sulla rete trofica ed in ultima analisi alterazioni delle sue funzioni. Storicamente gli aspetti funzionali sono stati piuttosto trascurati dagli ecotossicologi con la giustificazione che fenomeni di compensazione e ridondanze funzionali nella comunità proteggono la funzione facendone un endpoint meno sensibile della struttura, ma non mancano studi che dimostrano la maggiore sensibilità delle variabili funzionali [3, 30, 31]. Questo si verifica quando gli stessi meccanismi di compensazione sono danneggiati dallo stimolo disturbante o quando essi operino su una scala temporale più lunga delle misure di funzione [32].

#### *Ecosistema*

Al livello ultimo di ecosistema, i parametri misurati sono quelli che descrivono la struttura e la funzione sia nei compartimenti biotici che in quelli abiotici. La

struttura può essere investigata nei suoi vari aspetti fisici, chimici, genetici e di informazione. Lo studio della funzione utilizza parametri di flusso, quali flusso di energia, di materia (elementi e composti chimici, nutrienti), e di informazione (tra compartimenti biotici, all'interno degli organismi, tra compartimenti biotici ed abiotici) [33]. Si investigheranno, tra l'altro, alterazioni nella produttività di materia organica dell'ecosistema, respirazione della comunità, rapporto produttività/biomassa, durata di vita degli organismi, comparto abiotico (per esempio, ciclo dei nutrienti), catene trofiche, tasso di recupero [31, 32].

Tutti i parametri summenzionati relativi ai diversi livelli di organizzazione biologica rappresentano altrettanti *endpoint* ecotossicologici, che si misurano in sistemi sperimentali di complessità crescente per valutare gli effetti derivanti dall'esposizione a sostanze tossiche. È chiaro che ai livelli più complessi (popolazione, comunità, ecosistema) avremmo gli *endpoint* più rilevanti dal punto di vista ecologico ma inevitabilmente a scapito della sensibilità (per la complessità dei meccanismi coinvolti), della semplicità e riproducibilità [2, 34]. A livello sperimentale sono stati sviluppati diversi sistemi modello (microcosmi, mesocosmi, corsi d'acqua artificiali) che simulano ecosistemi naturali o porzioni di essi per valutare gli effetti sugli ecosistemi acquatici. Mesocosmi lentic sono stati frequentemente utilizzati negli studi con pesticidi, per i quali spesso è necessario valutare i possibili effetti, diretti ed indiretti, ed il potenziale di recupero delle comunità esposte in condizioni realistiche di destino e distribuzione ambientale. Molti e vari sono i problemi che si devono affrontare nella pianificazione, conduzione e interpretazione dei risultati di un studio con ecosistemi modello, che dipenderanno in gran parte dallo scopo dello studio [35, 36].

#### **Valutazione della qualità delle acque: le ragioni di un approccio integrato**

Una valutazione integrata è condotta perché, in generale, non abbiamo un'adeguata conoscenza della causa e dell'effetto per poter determinare la qualità ambientale [37]. Una valutazione affidabile della qualità delle acque si può realizzare solo attraverso l'impiego di specifiche indagini, che prendano in considerazione diversi aspetti dello stesso problema e pertanto si complementino a vicenda, contribuendo a fornire un quadro completo. L'uso di un approccio integrato, che tenga conto della componente chimica, biologica e tossicologica, è di beneficio sia alla valutazione della colonna d'acqua che a quella dei sedimenti, componente fondamentale di ogni corpo idrico naturale [37, 38]. Ciò vale in particolar modo per la valutazione di quell'area di confine (la cosiddetta zona grigia) compresa tra

un'area con elevata contaminazione e un'area dove la contaminazione non è significativa, dove l'uso di una sola componente valutativa può condurre a conclusioni incerte [39].

Il fatto che questo approccio multiplo sia stato promosso ed adottato, anche se a livelli diversi, in tutti i Paesi dove la politica ambientale è più avanzata [40] trova solide giustificazioni scientifiche e metodologiche. I metodi di valutazione integrata forniscono informazioni con un ottimo rapporto costi/benefici in quanto, tra l'altro, offrono evidenze empiriche della qualità, permettono una interpretazione ecologica delle proprietà fisiche, chimiche e biologiche di un ambiente reale, i dati ottenuti possono essere usati per sviluppare indici di classificazione basata sugli effetti [37].

Le analisi chimiche, relative ad una lista di inquinanti chimici in continuo aggiornamento, consentono di verificare se nell'ambiente siano stati superati i limiti di concentrazione fissati per le singole sostanze (obiettivi di qualità) che, a loro volta, sono definiti in base al loro potenziale tossico. I dati di monitoraggio chimico permettono, inoltre, di identificare le aree e le matrici ambientali dove i contaminanti si concentrano e quindi indicano dove focalizzare le indagini e gli interventi.

La valutazione chimica può essere affiancata da vari tipi di misure sul biota (biomonitoraggio): bioaccumulo, stato della comunità biologica, tossicità.

Le misure di bioaccumulo (condotte su pesci, macroinvertebrati bentonici, molluschi) consistono nel determinare la concentrazione di sostanze tossiche nei tessuti degli organismi e pertanto si possono considerare come monitoraggio chimico condotto su una matrice biologica.

L'analisi di integrità biologica viene effettuata a livello di comunità/ecosistema [41, 42] mentre le valutazioni tossicologiche possono essere condotte attraverso sperimentazione a diversi livelli di organizzazione biologica e con diversi sistemi sperimentali. Le metodologie chimiche ed ecologiche sono illustrate e discusse in altri contributi di questo volume, ai quali si rimanda.

Il significato di un approccio tossicologico alla valutazione di un corpo idrico risiede principalmente in alcune caratteristiche che lo contraddistinguono. Infatti una misura tossicologica condotta su una matrice ambientale, rispetto alle misure analitiche, fornisce informazioni più realistiche ed affidabili relativamente all'effettivo potenziale tossico di un corpo idrico [40, 42] in quanto:

- risponde a tutte le sostanze presenti (conosciute e non) ed alle interazioni tra esse, a differenza delle analisi chimiche che danno informazioni solo sulle sostanze cercate e su quelle presenti in concentrazioni rilevabili analiticamente;

- ingloba il fenomeno della biodisponibilità (la mera presenza di un tossico non indica necessariamente un rischio per il biota);

- integra gli effetti complessivi di tutti i fattori biotici ed abiotici presenti e delle interazioni tra essi e le sostanze tossiche presenti;

- tiene conto della proprietà delle sostanze di bioaccumularsi nei tessuti degli organismi.

Inoltre i test di tossicità sono relativamente semplici ed economici e forniscono dati di facile interpretazione e diretto utilizzo.

L'analisi dello stato delle comunità biologiche, quali quelle bentoniche, condivide con l'esame tossicologico le caratteristiche sopra elencate. Anzi, esso riflette ancor più realisticamente le condizioni dell'ecosistema in quanto è controllato da una molteplicità di fattori (fisici, chimici, geologici, biologici), ma, proprio per questa ragione, non permette di distinguere l'influenza dell'habitat dagli effetti tossici degli inquinanti quali fattori determinanti di una condizione degradata [42].

In una politica di riduzione delle emissioni, l'appropriatezza ed i vantaggi dell'indagine tossicologica per il monitoraggio degli effluenti sono particolarmente evidenti, essendo questi costituiti da miscele complesse la cui tossicità totale è difficilmente prevedibile per il numero e varietà di interazioni possibili tra i suoi componenti. L'esperienza in vari Paesi ha mostrato già da molto tempo che il controllo di parametri convenzionali (COD, BOD, solidi sospesi, calore) e inquinanti prioritari non sempre assicura l'eliminazione degli effetti tossici degli scarichi. [43, 44]. Si è andata così affermando la necessità di includere nel sistema metodi di valutazione dell'effluente *in toto*, che includano varie proprietà tra cui la tossicità acuta e cronica. Negli Stati Uniti, già dagli anni '80, i permessi per la maggior parte degli scarichi industriali e civili nelle acque superficiali sono accordati in base al rispetto di limiti di tossicità sia acuta che cronica dell'effluente *in toto*, tenendo conto della capacità diluente del corpo recettore [45].

L'importanza del monitoraggio tossicologico risiede nelle varie funzioni che assolve [46]. Se condotto sui corpi idrici riceventi svolge un ruolo di controllo, rilevamento di tendenza e, in prevalenza, segnalazione, in quanto:

- mette in luce condizioni di tossicità non rese palesi dall'analisi chimica o ecologica oppure conferma la presenza di tossicità in un'acqua di qualità chimica/ecologica scarsa;

- segnala l'eventuale presenza di fonti puntiformi o diffuse di inquinamento non note;

- offre una valutazione complessiva degli effetti di scarichi multipli;

- indica la tendenza verso una riduzione della tossicità, controllando così l'efficacia di un intervento di risanamento.

Quando è condotto sugli scarichi, il monitoraggio tossicologico ha ruolo di controllo, segnalazione, allarme e predizione, in quanto permette di:

- controllare l'efficacia delle misure di riduzione delle emissioni;
- misurare la conformità con i limiti di emissione fissati;
- prevenire/ridurre gli effetti tossici sui corpi riceventi;
- segnalare la gravità degli effetti consentendo di decidere priorità di interventi;
- fornire un allarme precoce di rilasci accidentali;
- predire gli effetti sui corpi riceventi.

Per una valutazione dei rischi più esaustiva ed anche per considerazioni di tipo economico, un esame tossicologico preliminare alle analisi chimiche può essere la via più sicura, rapida ed economica, in quanto gli effetti biologici possono dare indicazioni utili per orientare le analisi chimiche in modo mirato [37, 46, 47]. In questo modo si eviterebbe di incorrere in falsi negativi e falsi positivi, cioè di valutare come sani ambienti a rischio e viceversa, eventualità che è più probabile se la valutazione della contaminazione è basata solo sui dati chimici. Corrette conclusioni permettono di incanalare le risorse nella giusta direzione evitando di sprecarle investendole in azioni di recupero là dove non è necessario. Inoltre, per la sua funzione di segnalazione precoce il monitoraggio tossicologico di un corpo idrico (acqua e sedimenti) consente di individuare un rischio prima che si siano resi palesi danni al biota. Infatti, poiché in un ecosistema sottoposto ad uno stimolo disturbante (come per esempio quello chimico) entrano in gioco vari meccanismi di protezione (recupero, compensazione, riparo), è possibile che l'analisi del biota lo valuti ancora come integro (sistema sano). Solo quando tali capacità saranno superate le condizioni di perturbazione del sistema si evidenzieranno attraverso un'alterazione della sua struttura (sistema disturbato); se lo stimolo disturbante persiste, all'alterazione della struttura farà seguito l'alterazione della funzione (sistema collassato).

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 3 ottobre 2005.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Truhaut R. *Ecotoxicology. Objectives, principles and perspectives. Ecotoxicol Environ Saf* 1977;1:151-73.
2. Newman MC. *Fundamentals of ecotoxicology*. Chelsea (MI): Ann Arbor Press; 1998.
3. Forbes VE, Forbes TL. *Ecotoxicology in theory and practice*. London: Chapman & Hall; 1994.
4. European Council. Direttiva del Consiglio del 15 luglio 1991 relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari. 91/414/CEE. 1991.
5. European Commission. *Technical Guidance Document (TGD) on risk assessment of chemical substances following European regulations and directives*. Ispra, Italy: European Chemical Bureau (ECB); April 2003.
6. Moriarty F. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. London: Academic Press, Inc.; 1983.
7. Bacci E, Vighi M. Tossicologia classica, ambientale ed ecotossicologia: metodi strategie, obiettivi. In: Vighi M, Bacci E (Ed.). *Ecotossicologia*. Torino: UTET; 1998.
8. Rand GM, Petrocelli SR (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corp.; 1985.
9. Boethling RS, Mackay D. Property estimation methods for chemicals. *Environmental and health science*. Boca Raton, FL: Lewis Publisher; 2000. p. 189.
10. National Research Council. *Bioavailability of contaminants in soils and sediments. Processes, tools, and applications*. Washington: The National Academic Press; 2003. p. 420.
11. Organization for Economic Co-operation and Development. *Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures*. Annex 2. Paris: OECD; 2001. (Guidance Document 27, ENV/JM/MONO 8).
12. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guidelines for testing of chemicals. *Bioconcentration: Flow-through fish test*. Paris: OECD; 1996. (Guideline 305).
13. United States Environmental Protection Agency. *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. Washington DC: USEPA; 1999. (EPA/600/R-99/064).
14. Lake JL, Rublinstein HH, Lee L, Lake CA, Heltshe J, Pavignano S. Equilibrium partitioning and bioaccumulation of sediment-associated contaminants by infaunal organisms. *Environ Toxicol Chem* 1990;22(9):1095-106.
15. Kenaga EE. Correlation of bioconcentration factor of chemicals in aquatic and terrestrial organisms with their physical and chemical properties. *Environ Sci Technol* 1980;14: 553-6.
16. Meylan WM, Howard PH, Boethlibg RS, Aronson D, Printup H, Gouchie S. Improved methodology for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/Water partition coefficient. *Environ Toxicol Chem* 1999;18:664-72.
17. McGeer JC, Brix KV, Skeaff JM, DeForest DK, Brigham SI, Adams WJ, Green A. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem* 2003;22(5):1017-37.
18. European Commission. *Guidance document on aquatic toxicology (in the context of the Directive 91/414/EEC)*. Sanco/3268/2001. October 2002.
19. Carbonell G, Ramos C, Pablos MV, Ortiz JA, Tarazona JV. A system dynamic model for the assessment of different exposure routes in aquatic ecosystem. *Sci Total Environ* 2000;247: 107-18.
20. Baker S, Herrchen M, Hund-Rinke K, Klein W, Kördel W, Peijnenburg W, Rensing C. Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;56(1):6-19.
21. Janssen CR, Heijerick DG, De Schamphelaere KA, Allen HE. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environ Int*. 2003;28(8):793-800.

22. Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. *Principles of ecotoxicology*. London: Taylor & Francis; 1996.
23. McCarthy JF, Shugart LR. *Biomarker of environmental contamination*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 457.
24. Segner H, Braunbeck T. Cellular response profile to chemical stress. In: Schüürmann G, Markert B (Ed.). *Ecotoxicology*. John Wiley & Sons New York and Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 1998. p. 521-70.
25. Anderson RS, Giam CS, Ray LE, Tripp MR. Effect of environmental pollutants on immunological competency of the clam *Mercenaria mercenaria*: impaired bacterial clearance. *Aquat Toxicol* 1981;187-95.
26. Sanders BM. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:49-75.
27. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Detailed review paper on aquatic testing methods for pesticides and industrial chemicals*. Paris: OECD; 1998. (ENV/MC/CHEM(98)19/PART1).
28. Landis WG, Yu Ming-Ho. *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. 2<sup>nd</sup> edition. Boca Raton: CRC Press; 1999.
29. van Straalen NM, Kammenga JE. Assessment of ecotoxicity at the population level using demographic parameters. In: Schüürmann G, Markert B (Ed.). *Ecotoxicology*. John Wiley & Sons New York and Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 1998. p. 621-44.
30. Cairns J, Niederlehner BR, Smith EP. The emergence of functional attributes as endpoints in ecotoxicology. In: Burton GA Jr (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Boca Raton: Lewis Publisher; 1992. p. 111-28.
31. Fränze O. Sensitivity of ecosystems and ecotones. In: Schüürmann G, Markert B (Ed.). *Ecotoxicology*. John Wiley & Sons New York and Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 1998. p. 75-115.
32. Cairns JrJ, Niederlehner BR. Ecological function and resilience: neglected criteria for environmental impact assessment and ecological risk analysis. *Environ Professional* 1993;15:116-24.
33. Lieth H. Ecosystem principles for ecotoxicological analyses. In: Schüürmann G, Markert B (Ed.). *Ecotoxicology*. John Wiley & Sons New York and Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 1998. p. 17-73.
34. Burton GA. Assessing toxicity of freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* 1991;10:1585-627.
35. Giddings JM, Brock TCM, Heger W, Heinbach F, Maund SJ, Norman SM, Ratte HT, Schafers C, Streloke M (Ed.). *Community level aquatic system studies interpretation criteria*. SETAC; 2002.
36. Organization for Economic Co-operation and Development. *Draft guidance document on simulated freshwater lentic field tests (outdoor microcosms and mesocosms)*. (Draft). Paris: OECD; July 2004.
37. Chapman P, Power EA, Burton GA Jr. Integrative assessment in aquatic ecosystem. In: Burton GA Jr (Ed.). *Sediment toxicity assessment*. Boca Raton: Lewis Publisher; 1992. p. 313.
38. Long ER, Chapman PM. A sediment quality triad: Measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Mar Pollut Bull* 1985;16:405.
39. Burton GA Jr., Danton DL, Ho K, Ireland DS. Sediment toxicity testing: issues and methods. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (Ed.). *Handbook of ecotoxicology*. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: Lewis Publishers; 2003. p. 111-50.
40. Tonkes M, van de Guchte C, Botterweg J, de Zwart D, Hof M. *Monitoring water quality in the future. Volume 4: monitoring strategies for complex mixtures*. Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM); 1995.
41. La Point TW, Fairchild JF. Evaluation of sediment contaminant toxicity: the use of freshwater community structure. In: Burton GA Jr (Ed.). *Sediment toxicity assessment*. Boca Raton: Lewis Publisher; 1992. p. 87-110.
42. United States Environmental Protection Agency. *A guidance manual to support the assessment of contaminated sediments in freshwater ecosystems*. Washington DC: USEPA; 2002. (Vol. III. EPA-905-B02-001-C).
43. United States Environmental Protection Agency. *Biomonitoring to achieve control of toxic effluents*. Washington DC: USEPA; 1987. (EPA/625/8-87/013. p. 48).
44. Viganò L. Applicazioni del test di *Daphnia magna* alla tutela dei corpi idrici. In: *Atti del corso di formazione: utilizzazione di Daphnia magna in tossicologia ambientale*. Reggio Emilia 4-9 maggio 1987. Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale; 1987. p. 39-50.
45. United States Environmental Protection Agency. *Technical support document for water quality-based toxics control*. Washington DC: USEPA; 1991. p. 313.
46. De Zwart D. *Monitoring water quality in the future. Volume 3: Biomonitoring*. Bilthoven, the Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM); 1995.
47. Burton GA Jr, Rowland CD, Greenberg MS, Lavoie DR, Nordstrom JF, Eggert LM. A tiered, weight-of-evidence approach for evaluating aquatic ecosystems. In: Munawar M (Ed.). *Sediment quality assessment: approach, insights and technology for the 21<sup>st</sup> century*. Leiden: Backhuys Publisher; 2002. (Ecovision World Monograph Series).