

## Problematiche sperimentali inerenti la conduzione di saggi biotossicologici sui sedimenti

Roberto MINIERO (a), Elena DELLATTE (a), Carlo LUPI (b) e Alessandro DI DOMENICO (a)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) State Environmental Protection Agency of China, Pechino, Cina

**Riassunto.** - Nella presente rassegna vengono discussi alcuni dei fattori afferenti alla matrice d'esposizione che influenzano l'affidabilità di un saggio ecotossicologico con i sedimenti acquatici. Tali fattori sono costituiti dalle variazioni che vengono indotte nel sedimento dalle operazioni di raccolta, conservazione, manipolazione e preparazione delle matrici d'esposizione. Tali operazioni hanno una influenza marcata sulla biodisponibilità dei contaminanti contenuti nelle matrici e, perciò, sulla significatività dei saggi. In quest'ambito appare importante mantenere sotto controllo le variabili indicate al fine di produrre dati scientificamente validi e riproducibili per la valutazione del rischio ecologico.

*Parole chiave:* sedimenti, saggi ecotossicologici, affidabilità.

**Summary** (*Ecotoxicological bioassays on aquatic sediments: experimental problems of exposure matrices*).

- In this review a discussion on some factors influencing the exposure matrices which, in turn, influences the reliability of ecotoxicological bioassays on aquatic sediments, has been carried out. These factors include the variability induced on sediments by the sampling, storage, handling, and preparative operations. The exposure matrices-sediments *in toto*, interstitial water and elutriate, can be deeply modified by these actions, which alter the chemicals bioavailability and, therefore, the bioassay meaning. In order to obtain reproducible and scientifically valid data, to be used in the ecological risk assessment, all these factors need to be considered and kept under control.

*Key words:* sediments, bioassays, reliability.

### Introduzione

Questa rassegna è focalizzata sulla valutazione ecotossicologica dei sedimenti acquatici contaminati e, in particolare, su alcuni dei parametri metodologici che sono potenzialmente in grado di influenzare il risultato di tale valutazione.

Il grande sviluppo che negli anni passati ha avuto la valutazione ecotossicologica dei contaminanti che raggiungono il comparto acqua ha permesso di applicare il *know how* raggiunto alla valutazione degli effetti di sedimenti contaminati su organismi test.

Nella seconda metà degli anni '80 si iniziarono ad effettuare sperimentazioni in quest'area di ricerca e nel 1988 l'USEPA venne sollecitata a sviluppare dei criteri di qualità per sedimenti utilizzabili nell'ambito dei processi decisionali relativi al loro risanamento, manipolazione ed eventuale smaltimento. Con tale operazione, infatti, si sarebbe potuto usare questi criteri

per classificare la tossicità di campioni di sedimento rispetto a valori soglia definiti. Tre approcci, in particolare, vennero presi in considerazione:

- 1) criteri di qualità per l'acqua interstiziale;
- 2) ripartizione all'equilibrio;
- 3) saggi di tossicità con sedimenti fortificati.

I primi due sono metodi prevalentemente di natura chimica, mentre il terzo è un metodo biologico. Le prime due tecniche hanno una scarsa utilità per definire criteri di qualità locali o sito-specifici ma potrebbero essere impiegati per impostare linee-guida globali o obiettivi nazionali che, ad ogni modo, dovrebbero essere sostenuti da criteri regionali o locali basati su saggi ecotossicologici.

Nel 1992 l'OECD ha pubblicato un rapporto tecnico riguardante la valutazione biotossicologica dei sedimenti acquatici [1]. In questa monografia vengono presi in considerazione nella prima sezione otto metodologie diverse, corrispondenti agli approcci

EPA, mentre nella seconda sezione vengono affrontati i problemi metodologici correlati all'utilizzazione dei saggi nell'ambito dei singoli approcci. L'applicazione di questi saggi, infatti, è trasversale rispetto agli approcci descritti nella prima sezione e almeno in tre di questi ne costituisce l'asse portante.

Secondo l'OECD, con l'utilizzo di saggi è possibile determinare le correlazioni dose-risposta per sostanze chimiche individuali e miscele chimiche, individuare la specie-specificità d'azione degli xenobiotici e le correlazioni causa-effetto, nonché determinare la tossicità cronica e la misura del bioaccumulo. L'OECD pone in particolare l'accento sui numerosi punti relativi al processo di validazione in quanto, al di là delle molteplici caratteristiche positive, questa metodologia presenta ancora molti punti deboli.

Nel 1994, inoltre, è stato pubblicato un rapporto tecnico orientato essenzialmente a definire dei criteri per la raccolta ed il trattamento delle matrici da saggiare [2].

In questa breve rassegna si vuole dare un contributo alla discussione su alcune delle procedure che, apparentemente, influenzano in maniera cospicua la biodisponibilità dei contaminanti nei sedimenti.

### Campionamento

È impossibile campionare sedimenti senza disturbarne la struttura e le caratteristiche chimico-fisiche in quanto il processo di rimozione è distruttivo di per sé. Pochi studi trattano l'influenza che la manipolazione o la modifica potenziale di queste matrici esercita sulle risposte di tossicità ottenute nei saggi [3, 4]. Per quanto riguarda i sedimenti sono state definite alcune linee guida relative alla raccolta, alla conservazione, alla caratterizzazione e alla manipolazione in relazione al loro uso nei saggi di tossicità [5]. La scelta del campionatore, ad esempio, dipende dalle caratteristiche della matrice, dall'efficacia richiesta e dagli obiettivi dello studio. Una distinzione basilare tra i sedimenti acquatici, che condiziona fortemente la scelta dello strumento, è la percentuale di acqua presente nel campione e la granulometria della matrice: nell'ambito dei sedimenti acquatici, in generale per matrici composte prevalentemente di sabbia, è possibile utilizzare benne, mentre per matrici più compatte è raccomandato l'uso dei carotatori. Questi ultimi, inoltre, sono fondamentali quando l'interesse si concentra sulla valutazione tossicologica di strati differenziati di matrice.

Gli svantaggi nell'uso della benna sono numerosi: ridotta capacità di penetrazione, formazione di un'onda shock che provoca la perdita dei sedimenti fini più superficiali, perdite del profilo del campione non appena la benna viene aperta. Con la fuoriuscita

dell'acqua e dei sedimenti più superficiali durante il sollevamento possono essere perse, inoltre, due componenti fondamentali come i composti solubili in acqua ed i composti organici volatili presenti nei sedimenti [5]. La benna Ekman o Ekman-Birge è la più usata e la più precisa, anche se è limitata al campionamento dei sedimenti meno compatti o limosi, mentre per i sedimenti più compatti vengono usati carotatori come il Kaiak-Brinkhrst.

I carotatori, comunque, hanno alcune limitazioni [5]. In genere non lavorano bene nei sedimenti sabbiosi dove i campionatori a benna o i sommozzatori sono le uniche alternative utili. Inoltre, i piccoli carotatori (aventi diametro ridotto) possiedono un'onda di disturbo pronunciata nel campionamento dei sedimenti di cui possono alterare il profilo verticale. In ogni caso, quando vengono raccolte carote multiple, i carotatori forniscono migliori intervalli fiduciali e una migliore informazione areale rispetto alle benne [6]. Il sottocampionamento di campioni prelevati con il carotatore deve essere effettuato con estrema cura in quanto l'integrità dello strato di sedimenti più superficiali può essere facilmente distrutta.

È bene sottolineare che i primi centimetri dei sedimenti rappresentano la porzione biologicamente più attiva e quindi in molti casi ci si può limitare a campionare con carotatori a mano ad una profondità modesta. Quando, invece, l'interesse è rivolto all'individuazione del profilo di distribuzione verticale della contaminazione, le difficoltà operative e i costi dell'operazione si incrementano notevolmente. In quest'ultimo caso, infatti, è importante ottenere il maggior numero possibile di informazioni sullo sviluppo areale e verticale della contaminazione e sulle sue caratteristiche qualitative. La programmazione del campionamento deve naturalmente obbedire alla miglior rappresentatività della situazione. Si raccomanda, ovviamente, una adeguata pianificazione statistica del campionamento.

### Matrici di riferimento e controllo

La valutazione della tossicità *in situ* di sedimenti presuppone l'utilizzazione di campioni di controllo e di riferimento [5]. Un sedimento di riferimento potrebbe essere definito come una matrice che possiede caratteristiche simili a quelle della matrice test ma assenza di contaminanti. Naturalmente questa è una condizione pressoché ideale, in quanto non è inusuale che i sedimenti di riferimento vicini a quello campionato contengano un certo grado di contaminazione. Caratteristiche come la percentuale di carbonio organico, la dimensione delle particelle, la percentuale di acqua, le percentuali di limo, argilla, sabbia, il pH e l'equilibrio acido-base devono

mantenersi nell'intervallo di variazione della matrice saggiata [5]. In aggiunta, qualora l'obiettivo sia quello di saggiare l'effetto di matrici contaminate sui processi di ammonificazione o di nitrificazione, questi identici parametri devono essere quantificati e calibrati tra matrici di riferimento e matrici test.

In queste matrici si può verificare la presenza di contaminanti naturali, ciò comporta una valutazione tossicologica anche di queste matrici. Una matrice di controllo potrebbe consistere di matrice naturale o artificialmente preparata di sedimenti la cui composizione e/o grado di contaminazione siano conosciuti e di qualità consistente, già usati in precedenti saggi di tossicità e per cui esista una base di dati che attesti la loro non tossicità [5].

### Conservazione

Campionamento, essiccazione, congelamento e conservazione al freddo influenzano la biodisponibilità degli xenobiotici [5]. Il tempo di conservazione dei sedimenti può variare da pochi giorni a un anno e la refrigerazione dopo l'arrivo nei laboratori è generalmente effettuata a 4 °C [7]. Cambiamenti temporali significativi nella tossicità di campioni di sedimento contenenti metalli sono stati osservati in sedimenti conservati [3]. I limiti temporali raccomandati per la conservazione di sedimenti *spiked* con metalli variano da due giorni a meno di due settimane [3-5]. È stato osservato, inoltre, che anche la biodisponibilità dei contaminanti organici cambia con il progredire del tempo di conservazione.

La manipolazione e la conservazione potrebbero alterare la concentrazione di solfuri acidi volatili (*acidic volatile sulfides*, AVS) che potenzialmente influenzano la biodisponibilità dei metalli. La tossicità di Cd nei sedimenti mostra una certa correlazione con il grado di complessazione con AVS [8]. Gli AVS sono un *pool* di solfuri reattivi allo stato solido che apparentemente legano alcuni metalli riducendone la tossicità. Se l'obiettivo di un'indagine è quello di investigare la tossicità di matrici ambientali contenenti metalli e l'ambiente è anossico, l'esposizione all'aria potrebbe modificare in maniera consistente la tossicità a causa dell'ossidazione e della precipitazione delle specie metalliche o a causa della perdita delle specie metalliche complessate con AVS. Si ritiene, generalmente, che i sedimenti non dovrebbero essere congelati, ma mantenuti a 4 °C sotto vuoto o in atmosfera con N<sub>2</sub> per non più di due settimane prima del saggio. Il rapporto esistente tra fenomeni di turbolenza e biodisponibilità dei metalli è stato di recente analizzato in grande dettaglio [9]. Il disturbo dei sedimenti comporta, tra le altre cose, un cambiamento nelle proprietà chimiche dei sedimenti che, a sua volta, determina una drammatica modifica

nella biodisponibilità dei metalli (Hg e Pb). I fenomeni che influenzano la mobilità dei metalli, d'altra parte, hanno un'influenza limitata sui composti organici. In questo caso le dimensioni delle particelle dei sedimenti e il tempo di permanenza dei contaminanti di interesse modifica il loro tasso di desorbimento incrementando il suo valore con l'aumento delle dimensioni delle particelle e diminuendolo, rispettivamente, con l'invecchiamento della matrice.

Per le analisi chimiche contrariamente a quelle di tipo ecotossicologico, in genere, viene raccomandata una rapida refrigerazione delle carote che, però, altera la struttura dei sedimenti e ne modifica i profili a causa dell'elevato contenuto di acqua dei campioni. Inoltre, il congelamento sembra essere implicato nell'aumento della perdita di carbonio organico solubile che potrebbe influenzare, in una certa misura, il comportamento dei contaminanti organici. Il congelamento in atmosfere prive di O<sub>2</sub> sembra inibire l'ossidazione dei composti ridotti di Fe e Mn ed è stato raccomandato per conservare sedimenti da analizzare per la presenza di composti organici e nutrienti.

La composizione chimica dell'acqua interstiziale cambia significativamente dopo 24 ore di conservazione, perfino quando viene mantenuta alle medesime temperature del luogo di campionamento. Coagulazione e precipitazione degli acidi umici sono state osservate quando l'acqua interstiziale è stata immagazzinata a 4 °C per più di una settimana. L'ossidazione delle specie ridotte di As nell'acqua interstiziale di sedimenti conservati per 6 settimane non risultava influenzata quando i campioni erano acidificati e mantenuti in prossimità di 0 °C. Quando queste accortezze non venivano prese risultava necessaria una deossigenazione dei campioni stessi.

### Raccolta dell'acqua interstiziale

Questa matrice, per quanto di difficile caratterizzazione a causa delle difficoltà operative relative alla sua raccolta, risulta di estremo interesse perché implicata nell'esposizione ai contaminanti degli organismi che vivono a stretto contatto con il sedimento. Infatti, la sua raccolta e preparazione per l'uso nei saggi di tossicità riveste una certa importanza nella valutazione ecotossicologica dei sedimenti.

I metodi, tra quelli proposti, che consentono il maggior recupero di acqua interstiziale dai sedimenti sono la centrifugazione e la pressione.

Alcuni costituenti dell'acqua interstiziale come il carbonio organico disciolto (DOC) o il dimetilsolfuro potrebbero essere significativamente influenzati dal metodo di raccolta. Facendo in modo di prevenire l'ossidazione, alcuni parametri come la salinità, il carbonio inorganico disciolto, l'ammoniaca, il solfuro e il solfato potrebbero non essere influenzati dai

metodi di raccolta. Nel caso in cui la matrice si trovi in condizioni anossiche nell'ambiente di provenienza, tutti i passaggi coinvolti nella lavorazione del campione dovrebbero essere condotti in atmosfere inerti per prevenire l'ossidazione delle specie ridotte.

Se l'acqua interstiziale viene raccolta mediante centrifugazione e successiva filtrazione, bisogna prendere in considerazione gli effetti sulla sua composizione chimica e, quindi, sulla tossicità. La centrifugazione a 7600 giri in contatto di solo vetro ha mostrato di essere superiore ai metodi di filtrazione. Quest'ultima operazione viene normalmente condotta per rimuovere particelle sospese con membrane filtranti da 0,45 µm, anche se sono state raccomandate membrane con pori di 0,20 µm ed inferiori. Inoltre la reattività dei materiali di cui è costituito il filtro, con i componenti presenti nella matrice da filtrare è da tenere in considerazione quando si ritiene di dover procedere in questo senso; infatti la rimozione di particelle sospese mediante filtrazione può influenzare significativamente l'esposizione degli organismi agli xenobiotici.

### Elutriati

Molti studi sulla tossicità dei sedimenti sono stati condotti sull'elutriato o fase acquosa estraibile. Questo metodo fu sviluppato per valutare gli effetti delle operazioni di *dredging* sulla qualità delle acque all'inizio degli anni '70 dall'*US Army Engineer*. La metodica prevede l'agitazione dei sedimenti in acqua del luogo di campionamento o ricostituita (1:4 v/v ratio) per 30 minuti. La fase acquosa viene poi separata dai sedimenti per centrifugazione seguita da filtrazione del supernatante con filtri da 0,45 µm (obbligatoria quando devono essere effettuati test con microalghe planctoniche). Anche in questo caso la filtrazione potrebbe significativamente ridurre l'effetto biologico rimuovendo i contaminanti associati al particolato ed i contaminanti disciolti che si legano ai materiali del filtro. La scelta dei materiali dei filtri, quindi, può essere determinante ai fini del risultato del saggio. Questo metodo influenza la speciazione dei metalli, la concentrazione di ammoniaca, il pH e la tossicità. Il rapporto solidi/soluzione influenza l'assorbimento della sostanza nel sistema test e non dovrebbe essere sottovalutato quando si effettuano estrazioni dei sedimenti come la preparazione degli elutriati; potrebbe non essere un fattore critico, però, nei test con sedimenti tal quali [3] dove non c'è mescolamento.

### Spiking: metodo delle aggiunte

Un grande numero di studi di tossicità con sedimenti hanno usato la tecnica dello *spiking* o metodo delle aggiunte.

È stato affermato dall'OECD [1] che questo tipo di sperimentazione potrebbe risultare utile per sviluppare criteri di qualità ambientali per i sedimenti. Il metodo di *spiking* varia a seconda del tipo di contaminante: i composti organici sono generalmente solubilizzati in un *carrier* organico, mentre i metalli in una soluzione acquosa. I composti possono anche essere aggiunti direttamente all'acqua sovrastante i sedimenti (in un sistema d'esposizione bifasico acqua/sedimenti) consentendo al composto l'assorbimento ai sedimenti senza operare alcun mescolamento [5]. Occasionalmente il *carrier* viene aggiunto direttamente al sedimento [5] e poi evaporato prima dell'aggiunta di acqua. Sembra che questo metodo influenzi la distribuzione delle sostanze chimiche nei sedimenti in maniera diversa rispetto al metodo dell'aggiunta all'acqua sovrastante. I metodi principali per aggiungere i metalli ai sedimenti sono praticamente identici, con l'unica eccezione che il passaggio di evaporazione non viene effettuato [5, 10]. Il periodo di tempo che intercorre tra l'aggiunta delle sostanze chimiche e l'uso dei sedimenti nei saggi sembra influenzare la disponibilità biologica dei composti. Negli studi di questo tipo le condizioni di raggiungimento dell'equilibrio e le metodologie di mescolamento adottate variano largamente. La durata del contatto tra la sostanza chimica e le particelle di sedimenti, inoltre, può influenzare sia la ripartizione sia la biodisponibilità del tossico. Questo effetto può essere dovuto al fatto che la sostanza chimica va incontro prima ad un rapido assorbimento iniziale di natura labile seguito, successivamente, dal movimento della sostanza chimica nei siti d'assorbimento più resistenti. Infine, è importante riconoscere che la quantità di tossico aggiunto potrebbe eccedere la capacità di complessazione del sistema test dei sedimenti e non consentire il raggiungimento dell'equilibrio. Questi fenomeni complicano l'interpretazione dei risultati del test.

### Diluizione dei sedimenti

Al fine di ottenere informazioni sulle relazioni dose - effetto nelle valutazioni tossicologiche di matrici come sedimenti, devono essere usate differenti concentrazioni scalari della matrice test [11]. Le informazioni sulle metodiche di diluizione dei sedimenti sono scarse. In ogni caso deve essere usato un sedimento o un terreno "pulito" come "diluente" che, idealmente, dovrebbe avere caratteristiche simili a quelle della matrice test (rapporto materia organica/carbonio, granulometria), ma che non deve contenere quantità di contaminanti al di sopra di livelli di fondo [5, 11, 12].

Naturalmente l'aggiunta di matrice (sedimenti) "pulita" aumenta i siti potenziali d'assorbimento per i contaminanti, riducendo perciò l'effetto biologico in maniera non prevedibile sulla base della conoscenza

di un processo di semplice diluizione. In tutti i metodi dovrebbe essere considerato sia l'effetto del tempo di contatto dell'acqua interstiziale e della matrice (equilibrio), sia l'effetto di distruzione dell'integrità del sedimento sulla disponibilità di tossici. La misura del peso secco è il metodo di standardizzazione più conosciuto, anche se dal punto di vista biologico l'utilizzo di unità volumetriche comprendenti il contenuto in acqua e la densità della materia sembrano essere più significative [12].

### Condizioni di esposizione

Le condizioni di esposizione sono particolarmente cruciali nel determinare il comportamento dei composti tossici e la risposta degli organismi. I parametri di interesse includono il tempo di esposizione, il nutrimento, l'ambiente chimico-fisico e la fase test (sedimento, acque interstiziali, acque di percolamento, elutriati).

#### Tempo

Molti test di tossicità con i sedimenti sono stati limitati a test acuti in cui i tempi di esposizione variano dai 15 minuti per il saggio sulla luminescenza batterica (Microtox®) fino ai 28 giorni necessari per la riproduzione e la crescita di anfipodi.

Esiste un continuo dibattito nella tossicologia acquatica sulle definizioni, sulla rappresentatività ambientale e sulle relazioni esistenti tra test di tossicità acuta, subcronica e cronica. È stato osservato che, generalmente, saggi effettuati con organismi nei primi stadi di vita sono più sensibili e più significativi degli studi effettuati con adulti, in particolare quando l'*endpoint* di questi ultimi è costituito dalla mortalità. Rispetto ai saggi acuti, i vantaggi dei test subcronici consistono, principalmente, nella varietà e validità degli *endpoint* disponibili e nel risparmio di tempo che consentirebbe di effettuare più test rispetto ai saggi cronici, evitando così l'applicazione di fattori moltiplicativi per l'estrapolazione dei dati di tossicità dell'ambiente. Il costo, naturalmente, aumenta salendo nella scala: saggi acuti, subcronici, cronici, mentre la rappresentatività ambientale ha un andamento opposto. Ad ogni modo è stato evidenziato che la biodisponibilità di un contaminante fortemente idrofobico come il pirene diminuisce con l'aumento del tempo di contatto tra sedimenti e *Lumbriculus vulgaris*, un oligochete d'acqua dolce [13]. In aggiunta, è stato osservato che con il prolungarsi del tempo di equilibratura del campione di sedimento in laboratorio prima dell'esecuzione del saggio si manifesta una significativa diminuzione dell'attività batterica con conseguente influenza sulla biodisponibilità dei contaminati contenuti nel campione [14].

I saggi acuti rimangono quelli che, secondo un metodologia iterativa, hanno il ruolo di *screening* iniziale e quello di selezionare i campioni più rappresentativi su cui approfondire le analisi. Questo aspetto è discusso negli ultimi paragrafi.

#### Nutrimento

Gli stessi fattori ritenuti importanti nel controllo delle risposte ecotossicologiche dei saggi classici, come alimentazione degli organismi e condizioni fisico-chimiche, risultano altrettanto importanti nei saggi di tossicità con sedimenti e matrici assimilabili.

In un saggio effettuato con i sedimenti è stato rilevato che una ridotta alimentazione non diminuisce la sopravvivenza di organismi come gli anfipodi, ma influenza l'emergenza delle larve. Un aumento dell'alimentazione richiede, al contrario, condizioni di esposizione a flusso continuo e non statiche in quanto il mancato smaltimento di tutti gli alimenti può portare alla crescita di muffe e batteri.

Nei saggi con le fasi acquose, i cladoceri e i pesci non raccolgono cibo in maniera efficace quando nel contenitore è presente materiale sospeso, cosicché può verificarsi una crescita più marcata nei controlli, a livello individuale o di popolazione. Alimentazione costituita da alghe o altra materia organica può, inoltre, alterare l'ossigeno disciolto, il pH e/o la biodisponibilità degli xenobiotici. Tali parametri dovrebbero essere controllati, standardizzati e correlati, se possibile, alle condizioni *in situ*.

#### Parametri fisici e chimici

Nel caso dei saggi che impiegano elutriati, acqua interstiziale, condizioni di esposizione bifasiche come sedimento-acqua, ecc., devono essere controllati parametri come la torbidità, i composti organici disciolti, le microalghe ed altri solidi sospesi. È stata infatti osservata una influenza di questi parametri sulla biodisponibilità dei tossici ed è stato inoltre rilevato che questi possono variare nel corso del saggio. La temperatura può influenzare sia il comportamento delle sostanze chimiche, sia la fisiologia degli organismi; la luce naturale, con la sua componente ultravioletta, influenza la tossicità fotoindotta in presenza di idrocarburi policiclici aromatici [15-17].

#### Contatto con la matrice

Correlazioni tra la risposta degli organismi e la concentrazione dei contaminanti nei sedimenti sono state effettuate utilizzando organismi e matrici come sedimenti secondo il metodo delle aggiunte.

Il tempo di contatto sedimento-acqua potrebbe influenzare notevolmente la qualità dell'acqua sovrastante e, perciò, la risposta degli organismi.

La domanda d'ossigeno biochimica e chimica dei sedimenti può essere significativa ad esempio in matrici ricche in nutrienti e sostanze ridotte; oppure la dissoluzione delle componenti del sedimento come i carbonati, può elevare la durezza e perciò modificare la biodisponibilità dei metalli. Inoltre il disturbo dei gradienti redox e un'aumentata ossigenazione potrebbero ridurre i livelli di AVS e, perciò, provocare rilasci di specie metalliche libere [18].

#### Fase da saggiare

Uno dei punti di maggiore rilevanza nella valutazione tossicologica di matrici ambientali è la scelta della fase da saggiare più appropriata. Queste fasi possono essere suddivise in diverse categorie:

- a) fase estraibile non acquosa;
- b) fase estraibile acquosa (elutriati);
- c) fase acquosa interstiziale;
- d) fase solida (sedimento).

Ognuna di queste fasi ha associati i propri punti di forza e debolezza e le discussioni precedenti sull'assorbimento/perdita dei tossici sono particolarmente pertinenti quando si tenta di interpretare le risposte fornite da uno stesso organismo esposto a differenti fasi da saggiare.

In pochissimi casi sono state comparate diverse fasi con gli stessi saggi [15] o stesse fasi con differenti saggi [11]. Alcune fasi hanno dimostrato una maggiore o minore tossicità rispetto ad altre nei medesimi saggi [16]. Ad esempio l'acqua interstiziale ha mostrato una maggiore o eguale tossicità rispetto al sedimento tal quale.

È probabile che non possano essere effettuate correlazioni consistenti tra la tossicità relativa di saggi effettuati con acque interstiziali, elutriati, sedimenti, ecc., a causa della molteplice varietà di processi fisico-chimici e biologici coinvolti.

#### Conclusioni

Come si evince da quanto sopra esposto, la strada per risolvere in modo scientificamente affidabile molte delle problematiche afferenti alle condizioni e alla matrice d'esposizione, non è ancora stata trovata. La comparazione, ad esempio, della rispettiva tossicità delle tre matrici d'esposizione – sedimento, acqua interstiziale ed elutriato – nei confronti di organismi singoli ed appartenenti a diversi livelli trofici, così come dei fattori d'esposizione influenzanti la "biodisponibilità" degli xenobiotici d'interesse, necessita di grandissima attenzione per la definizione dei campi di utilizzazione di questi saggi. Il fine ultimo, infatti, è quello di riuscire a valutare in maniera affidabile la tossicità di queste matrici, con una

batteria di saggi composta da organismi appartenenti a diversi livelli trofici per il loro inserimento in processi decisionali.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 3 ottobre 2005.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Organization for Economic Co-operation and Development. *Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment*. Paris: OECD; 1992. (Environmental Monographs n. 60).
2. Environment Canada, *Guidance document on collection and preparation of sediments for physico-chemical characterization and biological testing*. Ottawa: Environment Canada; 1994. (Report EPS 1/RM/ 29, December 1994).
3. Stemmer BL, Burton GA JR, Sasson-Brickson G. Effect of sediment spatial variance and collection method on cladoceran toxicity and indigenous microbial activity determinations. *Environ Toxicol Chem* 1990;9:1035.
4. Martins De Carvalho PS, Zanardi E, Buratini SV, Camparelli and Martins MC. Oxidizing effect on metal remobilization and *Daphnia Similis* toxicity from a Brazilian reservoir sediment suspension. *Water research* 1998;32:193-9.
5. Burton GA Jr. Sediment collection and processing: factors affecting realism. In: Burton GA (Ed.). *Sediment toxicity assessment*. Ann Arbor, Mi: Lewis; 1992. p. 37-54.
6. Di Domenico A, De Felip E, Ferri F, Iacovella N, Miniero R, Scotto Di Tella E, Tafani P, Turrio Baldassarri L. Determination of the composition of complex chemical mixtures in the soil of an industrial site. *Microchem J* 1992;46:48.
7. Niederlehner BR, Pontash KW, Pratt JR, Cairns J JR. Field evaluation of prediction of environmental effects from a multispecies-microcosm toxicity test. *Arch Environ Contam Toxicol* 1990;19:62.
8. Di Toro DM, Zarba CS, Harisen DJ, Berry WJ, Swartz RC, Cowan CE, Pavlon SP, Allen HE, Thomas NA, Paquin PR. Technical basis for establishing sediments quality criteria for nonionic organic chemicals by using equilibrium partitioning. *Environ Toxicol Chem* 1991;10:1541.
9. Eggleton J, Thomas KW. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ Inter* 2004;30:973-80.
10. Sasson-Brickson G, Burton GA jr. In situ and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem* 1991;10:201.
11. Ditsworth GR, Schultz DW, Jones JKP. Preparation of benthic substrates for sediment toxicity tests. *Environ Toxicol Chem* 1990;9:1523.
12. Giesy JP, Rosin CJ, Graney RL, Henry MG. Benthonic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environ Toxicol Chem* 1990;9:233.

13. Conrad AU, Comber SD, Simkiss K. Pyrene bioavailability; effect of sediment-chemical contact time of uptake in an oligochaete worm. *Chemosphere* 2002;49:447.
14. Verrihest GC, Cortes S, Clement B, Montuelle B. Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediment. *Chemosphere* 2002;46:961.
15. Oris JT, Hall AT, Tylka JD. Humic acids reduce the photo-induced toxicity of anthracene to fish and *Daphnia*. *Environ Toxicol Chem* 1990; 9:575.
16. Gala WR, Giesy JP. Photo-induced toxicity of Anthracene to the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992;23:316.
17. Gunnarson JS, Sehaanning MT, Hylland K, Skold M, Eriksen D, Berge JA, Skey J. Interaction between Eutrophication and Contaminants. III. Mobilization and bioaccumulation of Benzo(a)pyrene from marine sediments. *Mar Pollut Bull* 1996;33:80-9.
18. Di Toro DM, Mahony JD, Hansen DJ, Scott KJ, Hicks MB, Mayr SM, Redurond MS. Toxicity of cadmium in sediments: the role of acid volatile sulfide. *Environ Toxicol Chem* 1990;9:1487.