

Problemi e metodi nella preconcentrazione dei campioni acquosi per la valutazione ecotossicologica delle acque superficiali

Silvana GALASSI

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi, Milano

Riassunto. - Il monitoraggio biologico e i saggi ecotossicologici sono metodi di indagine per la valutazione della qualità delle acque che la vigente normativa sulle acque (DL.vo 152/99) prevede siano applicati obbligatoriamente nel primo caso e come analisi supplementare nel secondo. Mentre le metodiche di applicazione dell'indice biotico esteso sono da lungo tempo standardizzate, le procedure di preconcentrazione del campione previste per i saggi ecotossicologici non lo sono altrettanto, essendo fino ad oggi state applicate solo a scopo di ricerca e non di monitoraggio. Per i microinquinanti organici la concentrazione può essere eseguita sia con solvente che su matrice solida: quest'ultima metodica presenta evidenti vantaggi sulla prima. In ogni caso, risulta evidente la necessità di procedere ad un esercizio di intercalibrazione su scala nazionale che coinvolga i laboratori che intendono utilizzare questa procedura nei loro futuri programmi.

Parole chiave: monitoraggio biologico, saggi ecotossicologici, normativa.

Summary (*Water matrices samples: pre-concentration problems and methodologies for ecotoxicological assessment of fresh waters*). - Biological monitoring and ecotoxicological investigation are research methods for water quality assessment included in the Italian regulation in force (DL.vo 152/99). Biological monitoring must be applied in every case while ecotoxicological investigation is not mandatory. While extended biotic index application methodologies are standardized, pre-concentration sample procedures applied for ecotoxicological investigation are not, because they are applied as research only. Pre-concentration for organic micro-pollutants can be carried out both by means of organic solvents and through SPE (solid phase extraction), being the latter more advantageous than the former. In any case, an intercalibration exercise should be undertaken to assess the applicability of the proposed procedure to all the national territory.

Key words: biological monitoring, ecotoxicological investigation, legislation.

Introduzione

Gli obiettivi di qualità delle acque superficiali per quanto riguarda il potenziale "rischio chimico" si basano su limiti ecotossicologici stabiliti mediante saggi di laboratorio o su valori ispirati al principio precauzionale, come nel caso dei pesticidi, che in genere corrispondono al limite di rilevabilità analitica. Questa impostazione di tipo riduzionistico presenta alcune limitazioni che possono essere enunciate nei seguenti punti:

- solo per l'1% delle sostanze chimiche conosciute esistono criteri di qualità (WQC, *water quality criteria*);
- alcuni WQC sono ancora in discussione in quanto basati su un numero insufficiente di dati tossicologici ed ecotossicologici;
- per alcune sostanze, soprattutto metalli, non è la concentrazione misurabile per via analitica ma quella realmente biodisponibile che dovrebbe essere

considerata ai fini della valutazione del rischio. Tuttavia tale frazione varia in funzione delle caratteristiche del mezzo;

- nel caso degli inquinanti organici vengono per lo più trascurati i metaboliti e i composti di neoformazione;
- risulta praticamente impossibile considerare gli effetti additivi e sinergici delle miscele;
- per alcune sostanze non esistono metodiche analitiche sufficientemente sensibili o/e selettive per la loro determinazione in acqua ai livelli che sarebbero richiesti in base ai criteri o standard di qualità.

Monitoraggio biologico

Il monitoraggio biologico sulle comunità naturali e i saggi ecotossicologici su singoli campioni o campioni integrati possono rappresentare sia un metodo di indagine preliminare, per la valutazione della qualità

delle acque [1], sia uno strumento complementare alla valutazione “sostanza per sostanza” condotta con metodologie analitiche. Il monitoraggio biologico, infatti, è in grado di rispondere in modo olistico al complesso dei potenziali fattori di stress presenti in un corpo idrico. La normativa per la tutela delle acque dall'inquinamento (DL.vo 152/99) prevede che per la valutazione degli impatti antropici siano utilizzati l'indice biotico esteso (IBE) come analisi obbligatoria e saggi di tossicità su campioni acquosi concentrati come analisi supplementari.

Tuttavia, mentre per l'IBE i laboratori pubblici di controllo hanno un'esperienza ormai consolidata e le metodiche sono state messe a confronto in diverse occasioni, le procedure di preconcentrazione con conseguente analisi ecotossicologica del campione acquoso concentrato, sono state utilizzate sinora solo a scopo di ricerca e non esistono procedure standardizzate.

Le difficoltà nella scelta di una procedura standard riguardano soprattutto i seguenti aspetti:

- scelta della metodologia di isolamento dei soluti;
- scelta del rapporto di preconcentrazione da utilizzare nei test che condiziona il volume di campione da raccogliere;
- scelta del/dei test;
- interpretazione dei risultati.

Per i microinquinanti organici, che rappresentano la categoria più sconosciuta dal punto di vista del rischio per la vita acquatica, la concentrazione può essere eseguita sia con solvente sia su matrice solida (SPE, *solid phase extraction*) come illustrato nella Fig. 1. Lo stato dell'arte delle metodiche di estrazione di soluti da matrici acquose, tuttavia, è alquanto scoraggiante per quanto riguarda i composti organici: si ritiene, infatti, che il 95% dei soluti polari non venga recuperato con le metodiche attualmente disponibili [2].

L'estrazione su matrice solida presenta comunque almeno tre vantaggi rispetto a quella con solvente:

- è più veloce;
- implica una minor esposizione degli operatori ai solventi che possono essere molto nocivi;
- evita lo smaltimento di grossi volumi di solvente.

In base a quanto si deduce dalla letteratura esaminata, la fase stazionaria di stirene-divinilbenzene, confezionata in colonne monouso da diverse ditte e avente un comportamento simile alle resine macroreticolari di amberlite e note con la denominazione commerciale di resine XAD, potrebbe essere utilizzata per la preconcentrazione dei campioni acquosi previa filtrazione per la rimozione dei solidi sospesi.

In relazione al secondo punto, e cioè quanto il campione debba essere preconcentrato, deve essere fatto riferimento alle conoscenze esistenti nel campo dell'ecotossicologia acquatica. È noto, infatti, che in

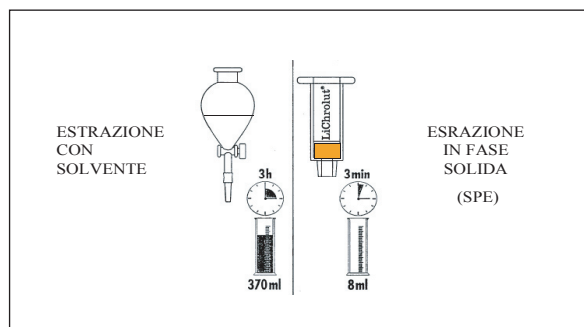


Fig. 1. - Differenti metodologie di preconcentrazione dei microinquinanti organici da un campione acquoso.

funzione della natura dell'agente tossico il rapporto tra la concentrazione che determina un effetto acuto e un effetto cronico può variare da poche unità a decine e centinaia, soprattutto nel caso di composti a lento accumulo. Poiché per la sorveglianza ambientale dei composti poco solubili in acqua e bioaccumulabili è più indicato il biomonitoraggio mediante organismi accumulatori (pesci e molluschi) e l'analisi dei sedimenti, lo scopo della preconcentrazione dovrebbe essere soprattutto rivolto alla determinazione degli inquinanti a polarità intermedia, che sono sufficientemente solubili in acqua da esplicitare effetti tossici acuti o cronici.

Per queste sostanze si può ritenere che un campione che non espliciti effetti acuti a rapporti di concentrazione superiore a 20, possa essere definito come poco pericoloso anche dal punto di vista di potenziali effetti cronici [3].

Test tossicologici

Una letteratura abbastanza ampia è disponibile sull'uso di matrici solide per la preconcentrazione di campioni acquosi, allo scopo di sottoporli a saggi ecotossicologici: un esempio è rappresentato da uno studio eseguito su campioni del fiume Po prelevati alla stazione di chiusura del fiume stesso [4]. In questo caso la preconcentrazione di grossi volumi d'acqua (50 litri) ha consentito di ottenere un volume di estratto sufficiente per determinare la tossicità acuta su *Daphnia magna* a diversi rapporti di concentrazione, in modo da calcolare il rapporto di concentrazione corrispondente alla IC_{50} (concentrazione che immobilizza il 50% degli animali) a 24 ore (Tab. 1).

La scelta dell'organismo su cui condurre il saggio dovrebbe tenere conto della sensibilità, che è generalmente riconosciuta ad una determinata specie, della sua rappresentatività e della facilità di conduzione del saggio. Per la scelta dell'organismo test il DL.vo

152/99 fa riferimento alla *Daphnia magna* e ai batteri bioluminescenti, mentre il test algale può essere eseguito sul campione non concentrato.

La procedura qui proposta per il saggio acuto con la dafnia può essere applicata anche per i test con i batteri bioluminescenti [3] e per i test di mutagenesi [7, 8] avendo eventualmente la precauzione di usare il solvente di scambio più appropriato.

Sia che si usi un solvente o una matrice solida per pre concentrare il campione d'acqua superficiale, sarà necessario, infatti, eliminare il solvente organico in cui sono disciolti i microinquinanti e trasferire i soluti nel mezzo previsto per gli organismi test. Questo passaggio è critico per il recupero quantitativo dei soluti più volatili dal momento che, durante l'evaporazione del solvente, anche i soluti a bassa tensione di vapore potrebbero co-evaporare. Normalmente nel saggio acuto con *Daphnia magna* è consentito utilizzare un quantitativo di solvente che non superi il valore di 100 mg l⁻¹, purché la stessa concentrazione sia presente anche nei controlli [4] e non determini effetti tossici. Per quanto riguarda la *Daphnia magna* possono essere utilizzati sia organismi allevati in laboratorio, sia kit commerciali purché se ne verifichi la sensibilità con sostanze di riferimento [9].

È da rilevare, infatti, che la variabilità di diversi cloni di *Daphnia magna* per la sensibilità ai tossici può essere molto elevata (Fig. 2 e 3).

Il problema della variabilità biologica, tuttavia, non può essere del tutto risolto con l'uso di una sola sostanza di riferimento, quale il bicromato di potassio, normalmente utilizzato per i test acuti. Altri tossici potrebbero dimostrare, infatti, divergenze maggiori nelle risposte di diversi ceppi (Fig. 4).

Tabella 1. - Risultati dei saggi di tossicità eseguiti su campioni di acqua pre concentrata del Po a Pontelagoscuro nel periodo 1988-89 [3]. Fattori di concentrazione che hanno provocato il 50% dell'immobilizzazione a 24 ore su *Daphnia magna*

Anno	Mese	Concentrazione
1988	Maggio	14
	Settembre	60
	Novembre	94
1989	Gennaio	43
	Febbraio	100
	Aprile	102
	Maggio	14
	Giugno	63
	Luglio	93
	Agosto	>130
	Settembre	>130

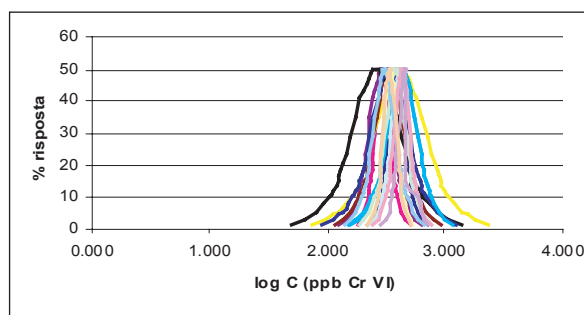


Fig. 2. - Distribuzione delle gaussiane relative agli effetti tossici determinati con cromo esavalente su diversi cloni di *Daphnia* allevati da dafnidi schiusi da un lotto di efippi.

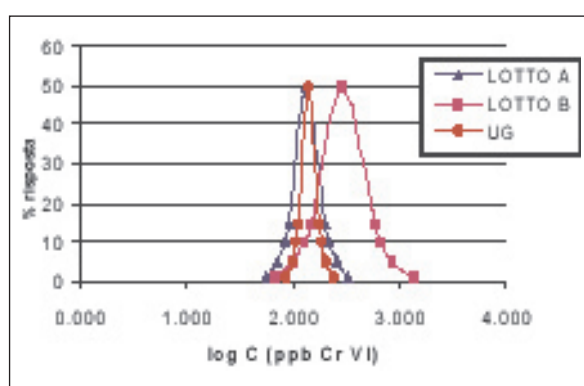


Fig. 3. - Distribuzione delle gaussiane relative agli effetti tossici determinati con cromo esavalente su dafnidi provenienti da diversi allevamenti di cloni partenogenetici.

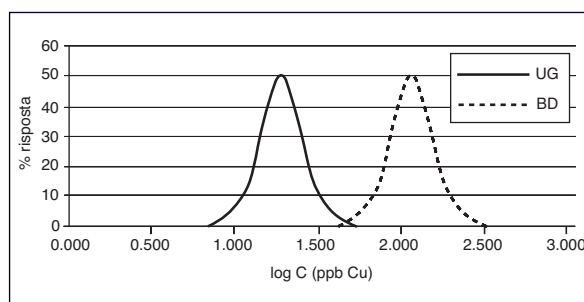


Fig. 4. - Sensibilità al rame bivalente di dafnidi provenienti dal clone UG e da un clone allevato da efippi (BD).

Questo aspetto dovrebbe essere maggiormente indagato su basi genetiche e verificato su campioni naturali, che possono contenere miscele complesse di microinquinanti organici.

Conclusioni

Affinché si possa procedere alla proposta di una metodologia standardizzata per il monitoraggio del rischio legato alla presenza di microinquinanti

superficiali nelle acque superficiali, come proposto dal DL.vo 152/99, è necessario procedere ad un esercizio di intercalibrazione su scala nazionale che coinvolga i laboratori che intendono utilizzare questo approccio nei loro futuri programmi.

In collaborazione con IRSA-CNR, è in corso di svolgimento un progetto finalizzato anche ad una proposta di procedura che, con opportune modifiche, potrebbe diventare la metodologia standard da adottare in questo esercizio. Solo successivamente, sulla base dei risultati ottenuti su diversi corpi idrici nazionali, sarà possibile l'adozione di un protocollo definitivo.

Lavoro presentato su invito
Accettato il 3 ottobre 2005.

BIBLIOGRAFIA

- Galassi S, Benfenati S. Fractionation and toxicity evaluation of waste waters. *J Chromatogr A* 2000;889:149-54.
- Castillo M, Alonso C, Barcelo D. Identification of polar, ionic, and highly water soluble organic pollutants in untreated industrial wastewaters. *Environ Sci Technol* 1999;33:1300-6.
- Galassi S, Guzzella L, Croce V. Screening organic micro pollutants in surface waters by SPE extraction and ecotoxicological testing. *Chemosphere* 2004;54:1619-24.
- Galassi S, Guzzella L, Mingazzini M, Viganò L, Capri S, Sora S. Toxicological and chemical characterization of organic micro pollutants in river Po waters (Italy). *Water Res* 1992;1:19-27.
- Organization for Economic Co-operation and Development. *Revised proposal for updating Guideline 2002 - Daphnia sp. Acute immobilization test*. (OCSE Guidelines for Testing Chemicals).
- Guzzella L, Gronda A. La contaminazione da microinquinanti organici nelle acque del nodo Lambro-Po: risultati del test di tossicità con *Vibrio fischeri*. *Acqua Aria* 1995;7:743-50.
- Guzzella L, Sora S. Mutagenic activity of lake water samples used as drinking water resources in Northern Italy. *Water Res* 1998; 32-6: 1733-42.
- Guzzella L, Ferretti D, Zerbini I, Monarca S. Evaluation of genotoxicity of Italian lakewater for human consumption: a case study in Lombardy. *Toxicol Environ Chem* 1999;73:81-92.
- Galassi S, Croce V. Test acuto con Daphtoxkit F magna per la valutazione della tossicità di un effluente industriale e l'individuazione dei composti tossici. *Biol Amb* 2000;14:21-8.