

Università degli Studi di Trieste
A.A. 2020-2021

Corso di Studio in
SM57 - ECOLOGIA DEI
CAMBIAMENTI GLOBALI

A scelta dello studente – I Semestre

Aula C1 -
Edificio CLA
M-TEAMS



ECOTOSSICOLOGIA
Prof. Monia Renzi (BIO/07)
mrenzi@units.it

(*) Il materiale didattico fornito dal docente può contenere parti o immagini soggette a copyright, la diffusione e/o riproduzione non è autorizzata.

INTRODUZIONE AL CORSO



.....

Evoluzione storica della disciplina

Concetti generali introduttivi:
metodi, strategie e obiettivi

Ambiti e differenze con
tossicologia classica, tossicologia
ambientale, ecologia

Effetti ecotossicologici a vari livelli
di complessità bioecologica: scale
spaziali, dimensionali e temporali

Normative ambientali nazionali e
sovrnazionali

Esempi e casi di studio anche in
ambito marino

PERCHÉ CONOSCERE L'AMBIENTE E IL RAPPORTO CON L'UOMO?

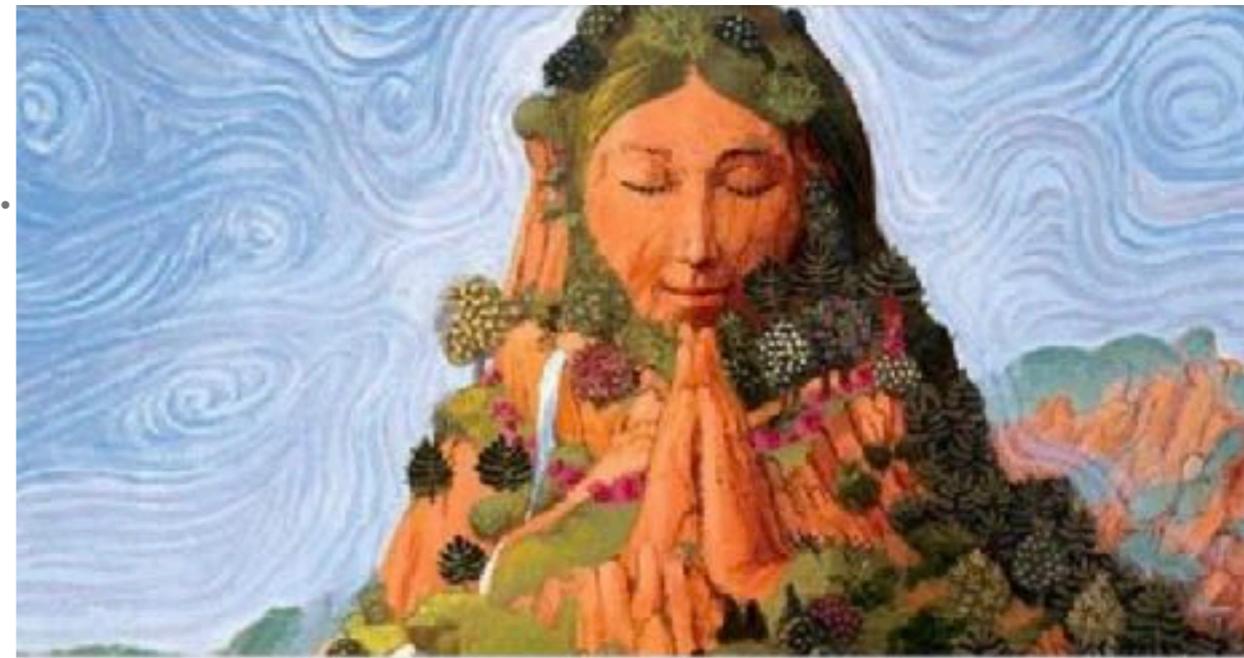
La scienza è prima di tutto un insieme di atteggiamenti. È una disposizione a trattare i fatti piuttosto che ciò che qualcuno ha detto su di loro ...

La scienza è una volontà di accettare i fatti anche quando sono contrari ai desideri ... l'opposto del desiderio è l'onestà intellettuale.

Gli scienziati hanno semplicemente scoperto che essere onesti, con se stessi e con gli altri, è essenziale per il progresso.

Gli esperimenti non sempre escono come ci si aspetta, ma i fatti devono restare in piedi, non le aspettative.

Skinner, 1953, Scienza e comportamento umano.



NOTIZIEIN.IT

Bolivia riconosce legalmente Madre Natura come un essere vivo » Notizie IN

Percezione rispetto alle sostanze chimiche

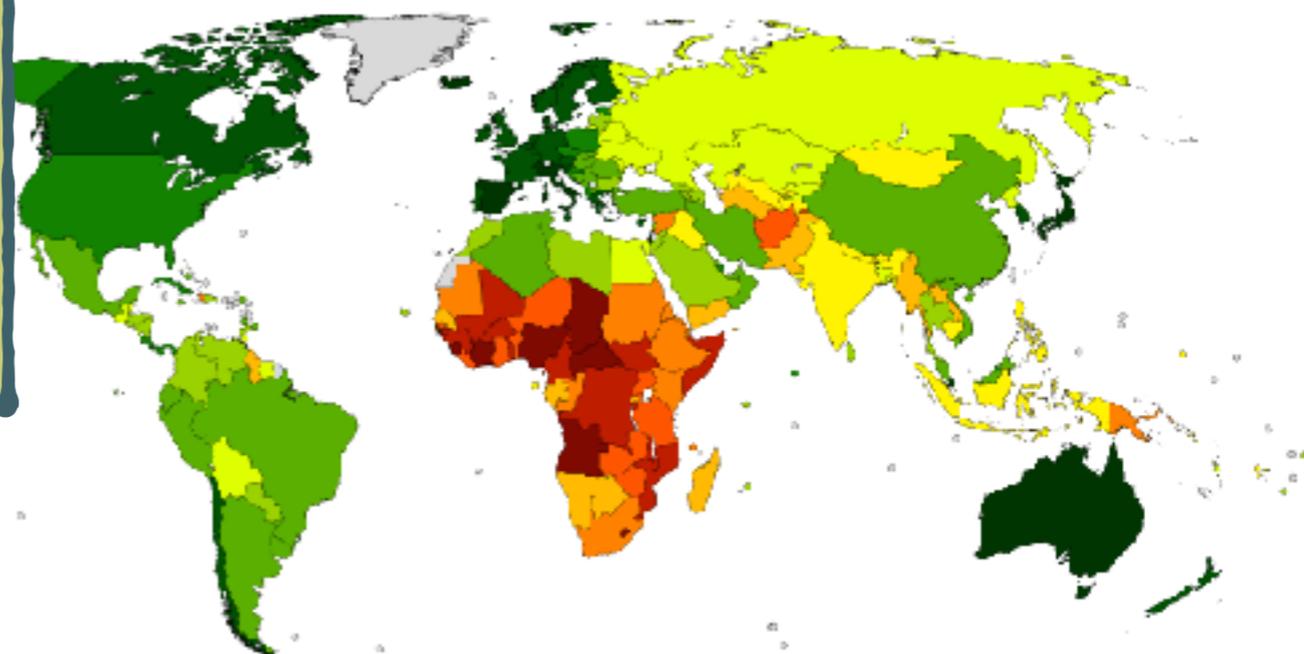
- ❖ Cosa guida la nostra percezione?
- ❖ E' possibile salvare il Pianeta?
- ❖ Le sostanze chimiche sono "cattive"?

1

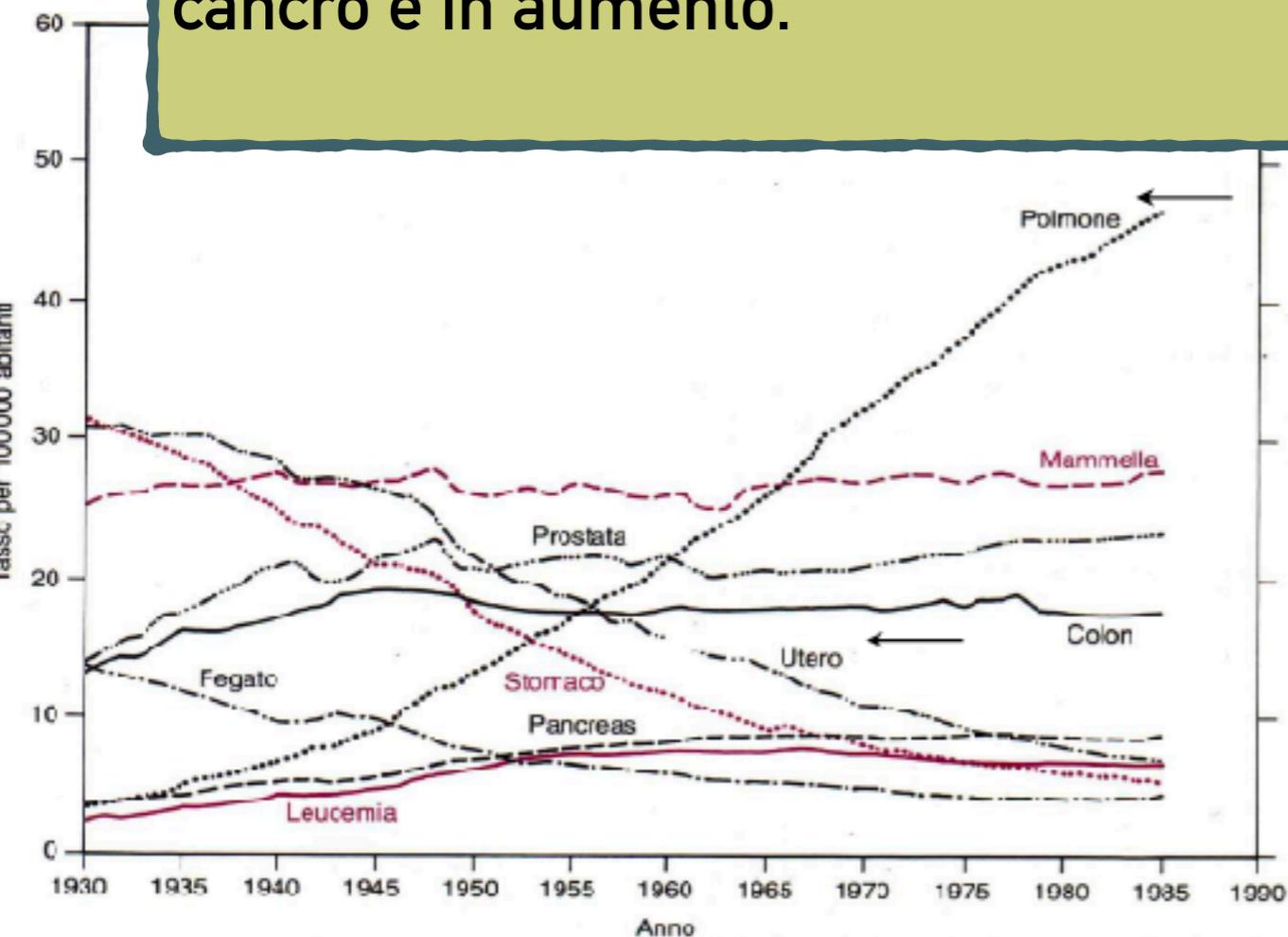
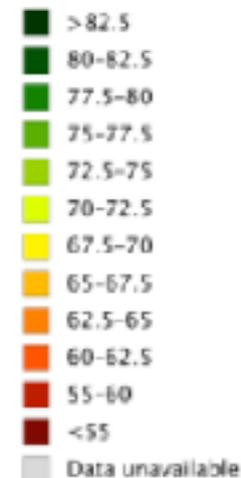
PERCEZIONE CONTRO REALTÀ

Aumento dell'aspettativa di vita nei paesi industrializzati. I tassi di mortalità per cancro (non fumatori) sono costanti o in calo.

L'inquinamento contribuisce in modo significativo al cancro e il tasso di cancro è in aumento.



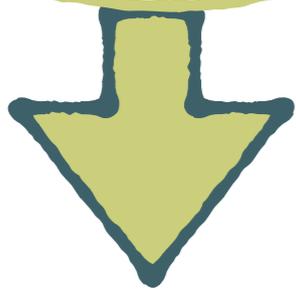
Countries by average life expectancy (2015)



Tasso per la popolazione standardizzata per l'età sulla popolazione degli Stati Uniti nel 1970
Fonte: National Center for Health Statistics and Bureau of Census, Stati Uniti
Nota: i tassi si riferiscono alla somma dei due sessi tranne i casi di mammella, utero e prostata

2

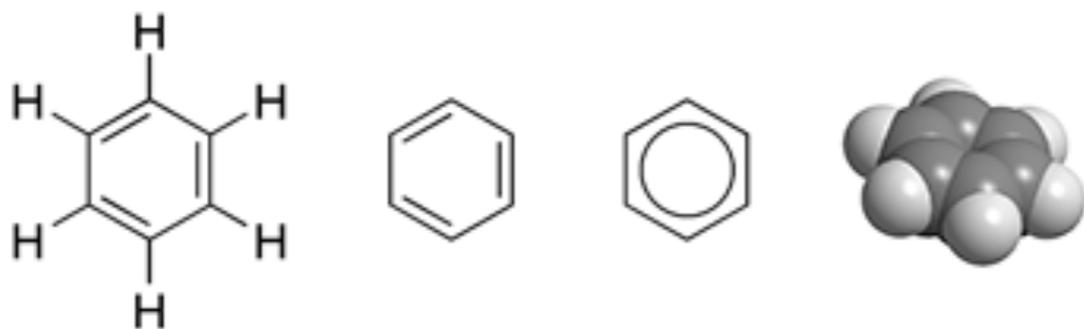
PERCEZIONE CONTRO REALTÀ



Test sul cancro ad alte dosi sugli animali forniscono dati significativi sui rischi di cancro per l'uomo

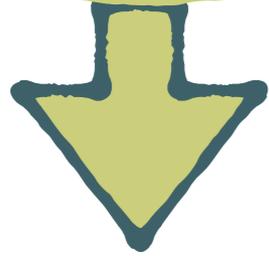
Metà di tutte le sostanze chimiche naturali o sintetiche testate nei test standard sul cancro degli animali si sono rivelate cancerogene. Vicino a dosi tossiche, la dose massima tollerata, può causare lesioni cellulari croniche o mitosi - rischio di cancro

Il benzene non mostra cancerogenicità nel topo ma ha dato evidenza di chiaro effetto cancerogeno nell'uomo (rene).

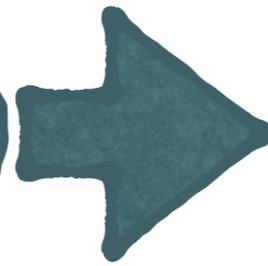


3

PERCEZIONE CONTRO REALTÀ



L'esposizione umana ad agenti cancerogeni e altre tossine è quasi tutta dovuta a sostanze chimiche



La quantità di residui di pesticidi sintetici negli alimenti vegetali è insignificante rispetto alla quantità di pesticidi vegetali naturali.

Tra 5-10.000 pesticidi naturali consumati, per un totale di 1500 mg/giorno.

Insetticidi di origine naturale:

Nicotina, isolata dal tabacco, e altri alcaloidi di minore interesse (anabasina e nornicotina);

Piretrine, estratte dal *Chrysanthemum cinerariaefolium*;

Rotenone, contenuto nelle radici di varie piante e soprattutto in *Derris elliptica* (leguminosa tropicale);

Quassio, presente nei tessuti legnosi di *Quassia amara* e di *Picrasma excelsa*.

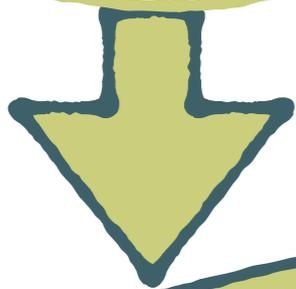
Stricnina, estratta dalla *Strychnos nux-vomica*, e la droga estratta dalla *Scilla maritima* sono state impiegate come rodenticidi.

Griseofulvina, prodotta dal *Penicillium griseofulvum*, e la cicloesimmide, prodotta dallo *Streptomyces griseus*, hanno trovato qualche impiego come fungicidi.

Alcune di queste sostanze non sono ancora esattamente conosciute nelle loro caratteristiche chimiche e biologiche.

4

PERCEZIONE CONTRO REALTÀ



Le tossine sintetiche presentano rischi cancerogeni maggiori rispetto alle tossine naturali.

Le sostanze naturali non sono tossiche.



Veleni più potenti al mondo

- 1 - Ricina, fibra solida dei chicchi di riso
- 2 - Batracotossina, alcaloide neurotossico, rana dorata (Sud America)
- 3 - Maitotossina, organismi marini
- 4 - Saxitossina, organismi marini
- 5 - Botulino, batteri anaerobi

Altre sostanze tossiche dei vegetali:

<http://sperimentazione.altervista.org/tossine.html>

La proporzione di sostanze chimiche naturali cancerogene quando testate su ratti e topi è la stessa delle sostanze chimiche di sintesi, circa la metà.

Tutte le sostanze chimiche sono tossiche oltre a una certa dose

Il 99,9% delle sostanze chimiche ingerite sono naturali.

La cicuta maggiore (*Conium maculatum* L., 1753) è tossica sia per il bestiame sia per l'uomo; la dose mortale per un essere umano è qualche grammo di frutti verdi.

La tossicità è dovuta alla presenza di alcaloidi: la coniina, la conidrina, la pseudoconidrina, la metilconicina e la coniceina.

La coniina, una neurotossina, è l'alcaloide più attivo e agisce a livello delle sinapsi neuromuscolari.

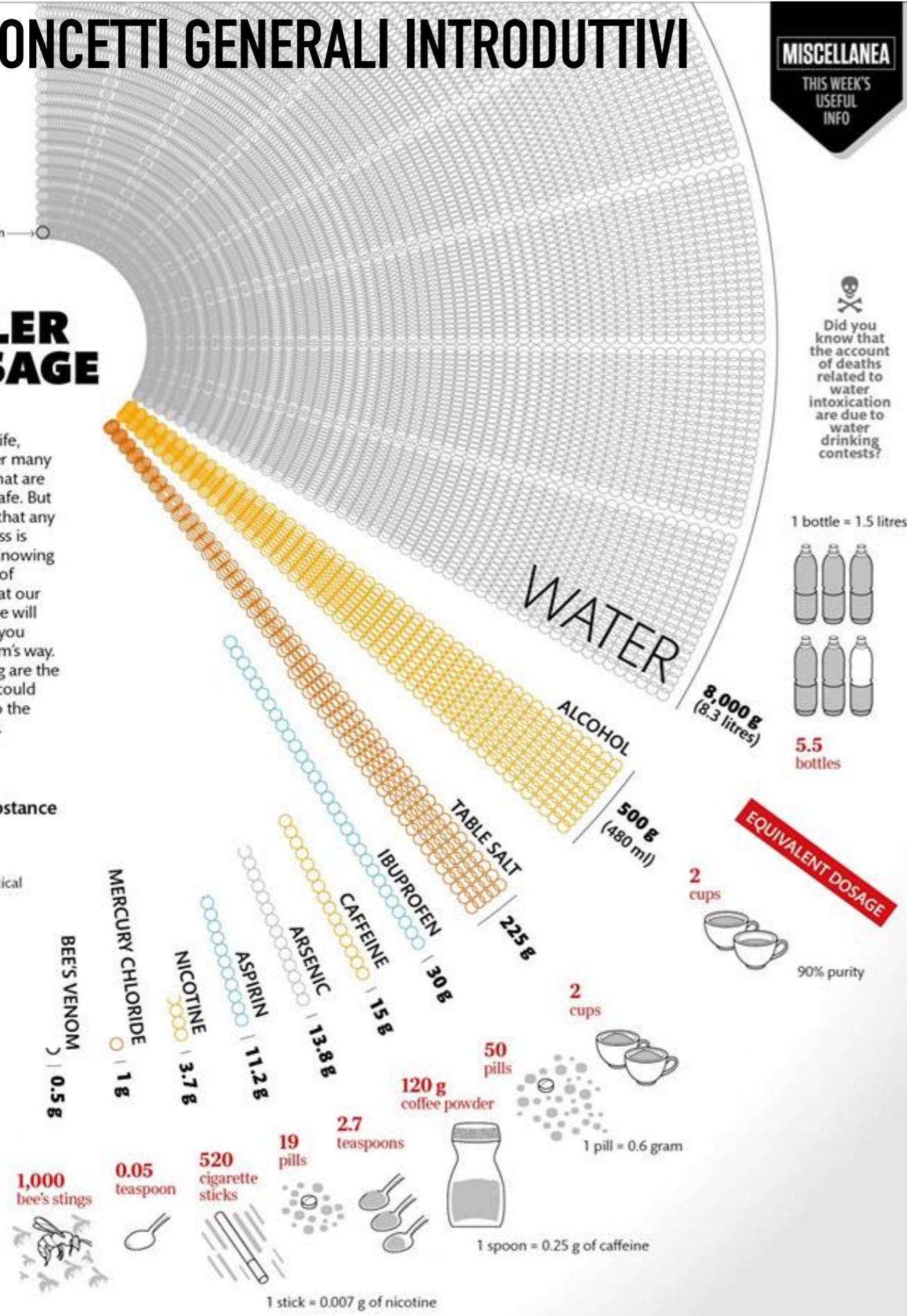
CONCETTI GENERALI INTRODUTTIVI

MISCELLANEA
THIS WEEK'S USEFUL INFO

KILLER DOSAGE

In everyday life, we encounter many substances that are considered safe. But we all know that anything in excess is dangerous. Knowing the quantity of substance that our body can take will always keep you from the harm's way. The following are the dosage that could prove fatal to the human body.

- Type of substance
- Biological
 - Organic
 - Pharmaceutical
 - Inorganic
 - Industrial



Did you know that the account of deaths related to water intoxication are due to water drinking contests?

La tossicità delle sostanze è legata alla dose a cui si è esposti

300 g di NaCl o meno di 1 kg di zucchero ingeriti nello stesso pasto sono letali per l'uomo. Tutte le sostanze sono sicure se l'esposizione è contenuta entro limiti tollerabili.

Tossicità per l'uomo di alcune sostanze/miscele chimiche

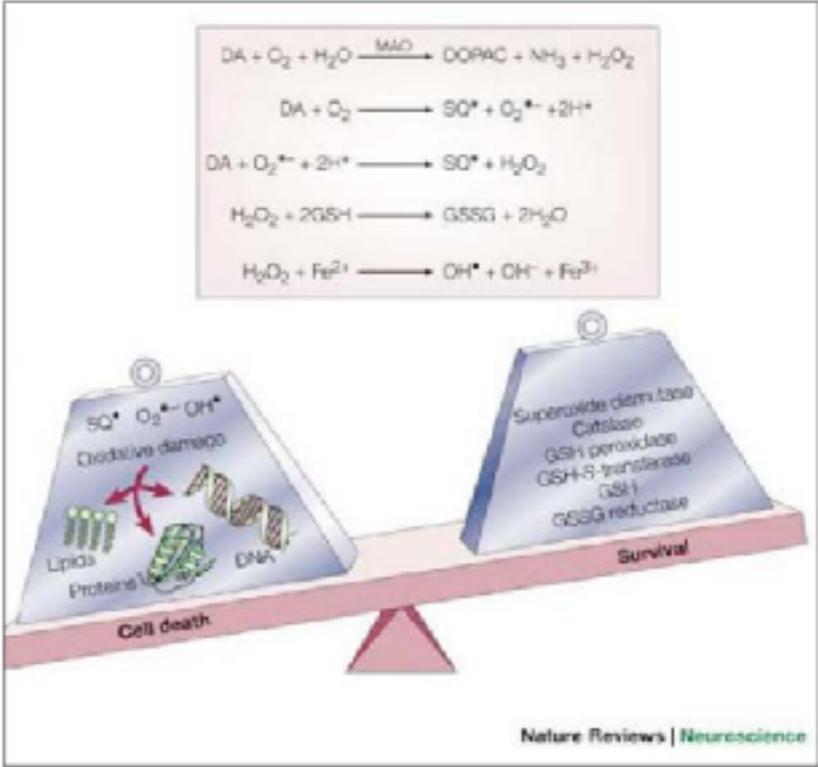
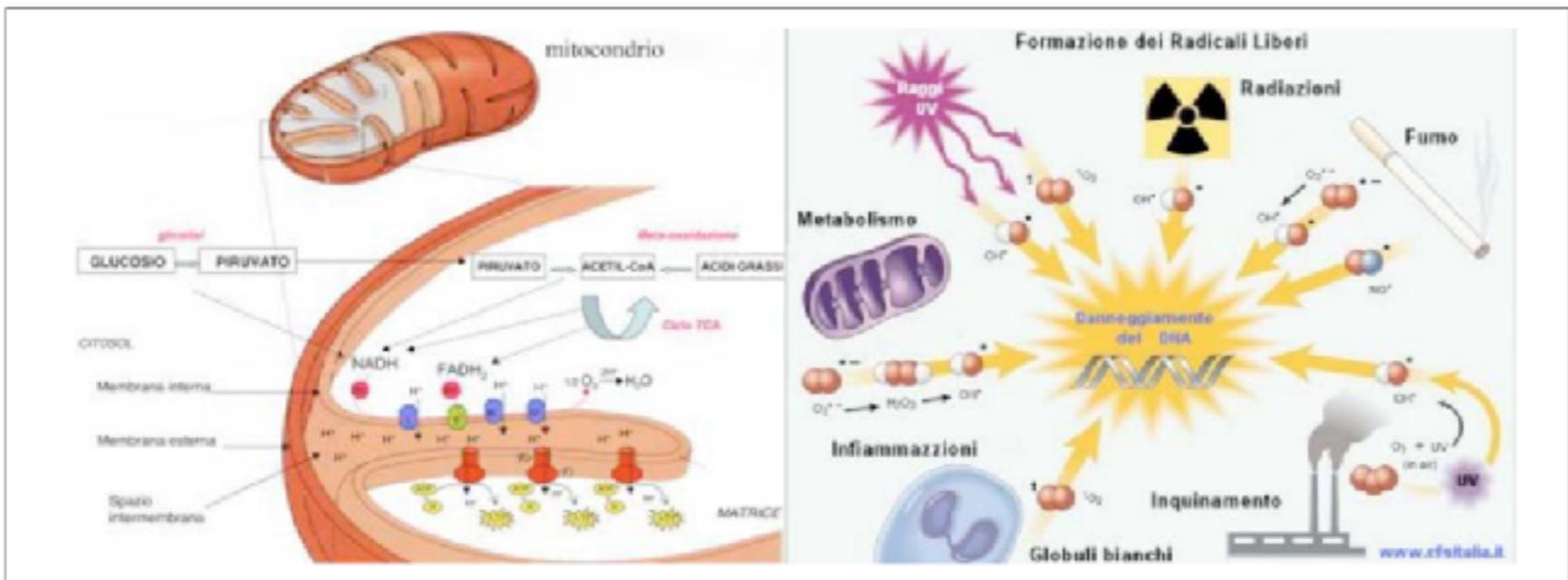
“Omnia venenum sunt: nec sine veneno quicquam existit. Dosis sola facit, ut venenum non fit” (Paraclesus)

5

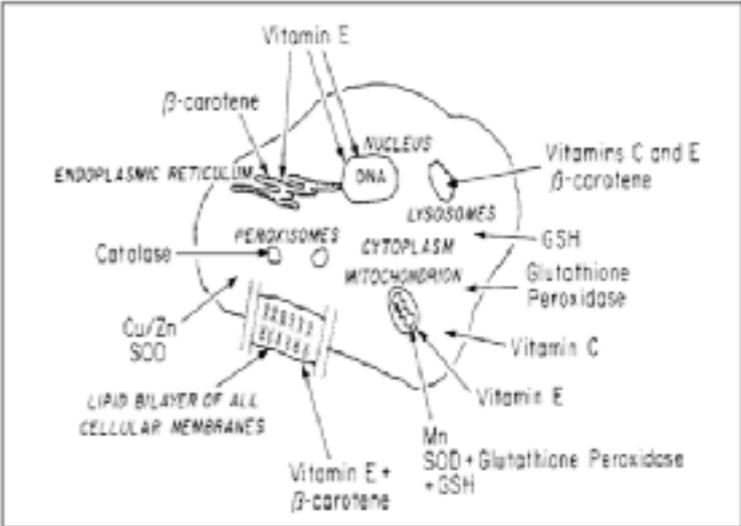
PERCEZIONE CONTRO REALTÀ

Gli esseri umani hanno molte difese generali e naturali che ci rendono ben protetti contro le normali esposizioni alle tossine, sia naturali che sintetiche.

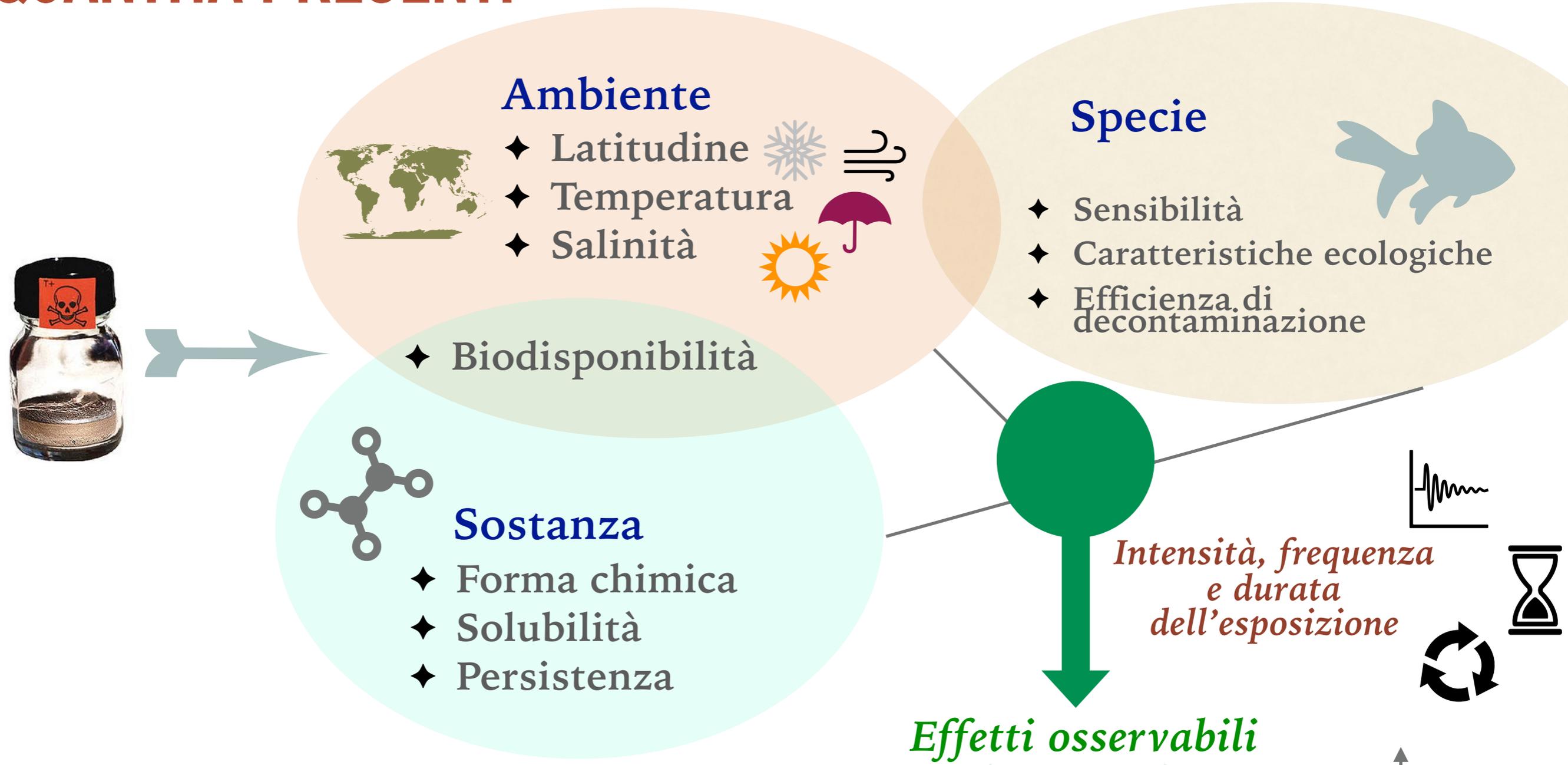
La tossicologia delle sostanze chimiche prodotte dall'uomo è diversa da quella delle sostanze chimiche naturali.



Equilibrio tra produzione ed eliminazione di specie ossidanti

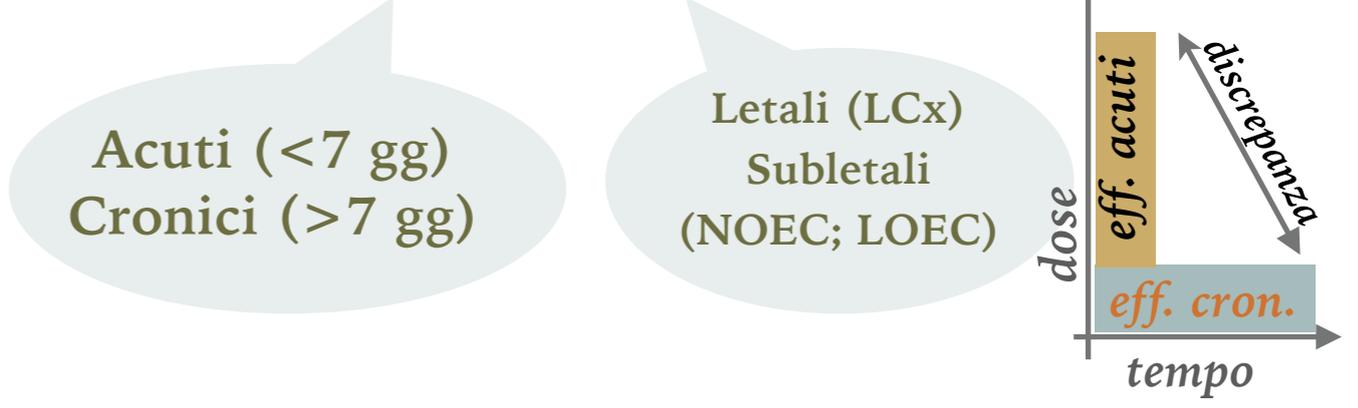


LA TOSSICITÀ NON DIPENDE SOLO DALLE QUANTITÀ PRESENTI



MOLTI FATTORI POSSONO MODULARE:

- DOSE / CONCENTRAZIONE EFFICACE
- RISPOSTE BIOLOGICHE



6

PERCEZIONE CONTRO REALTÀ

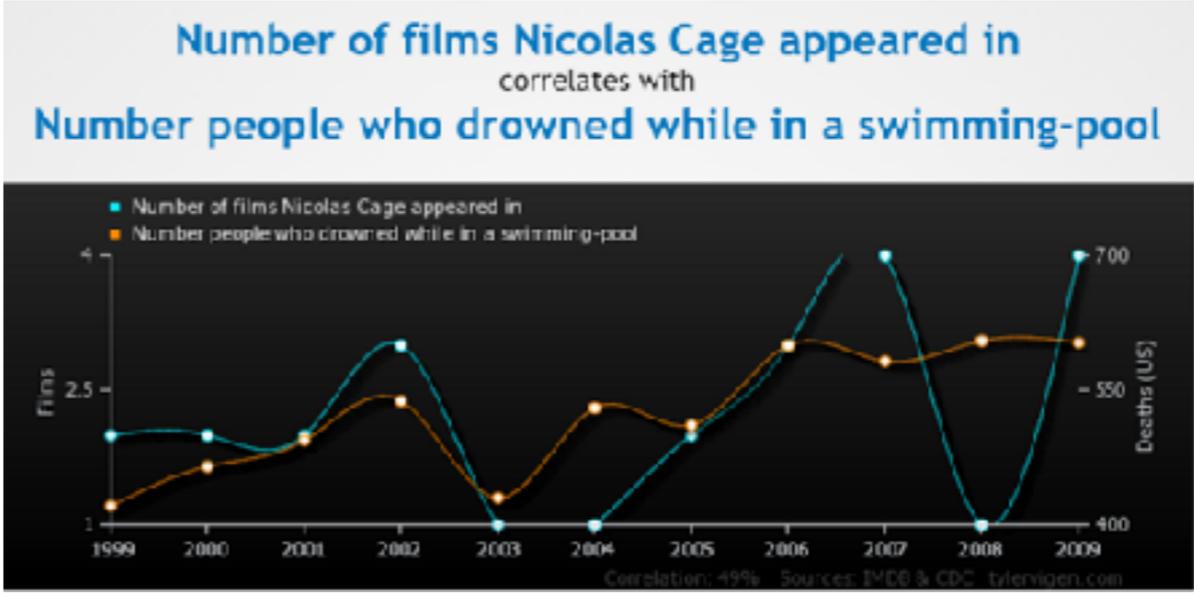
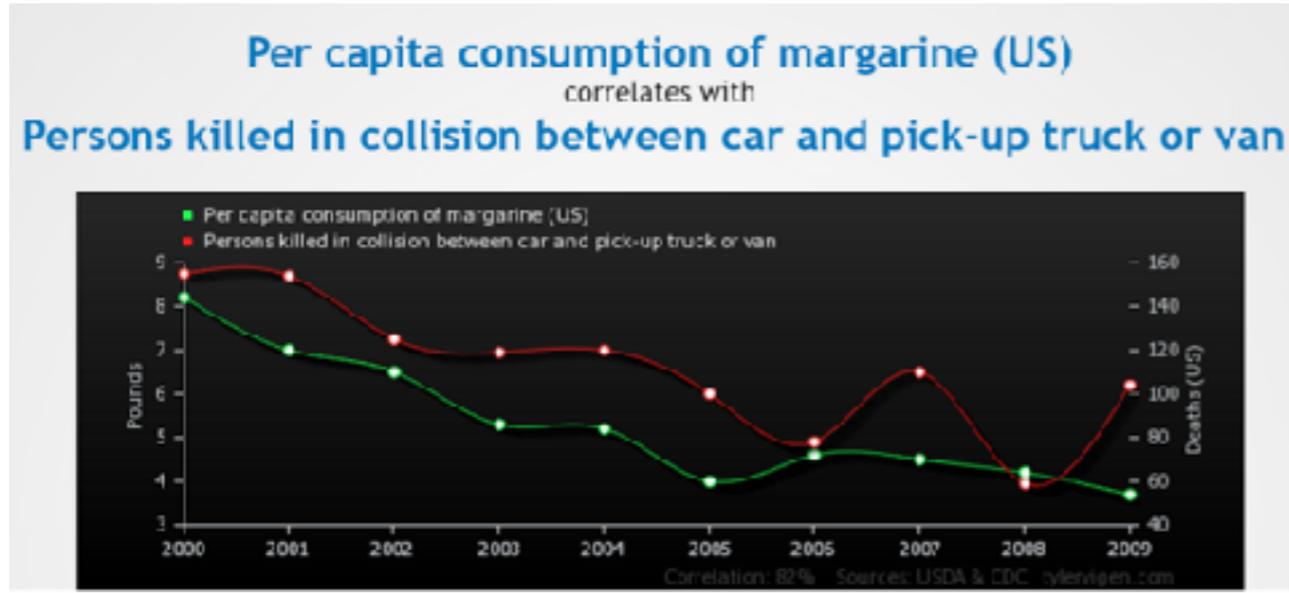
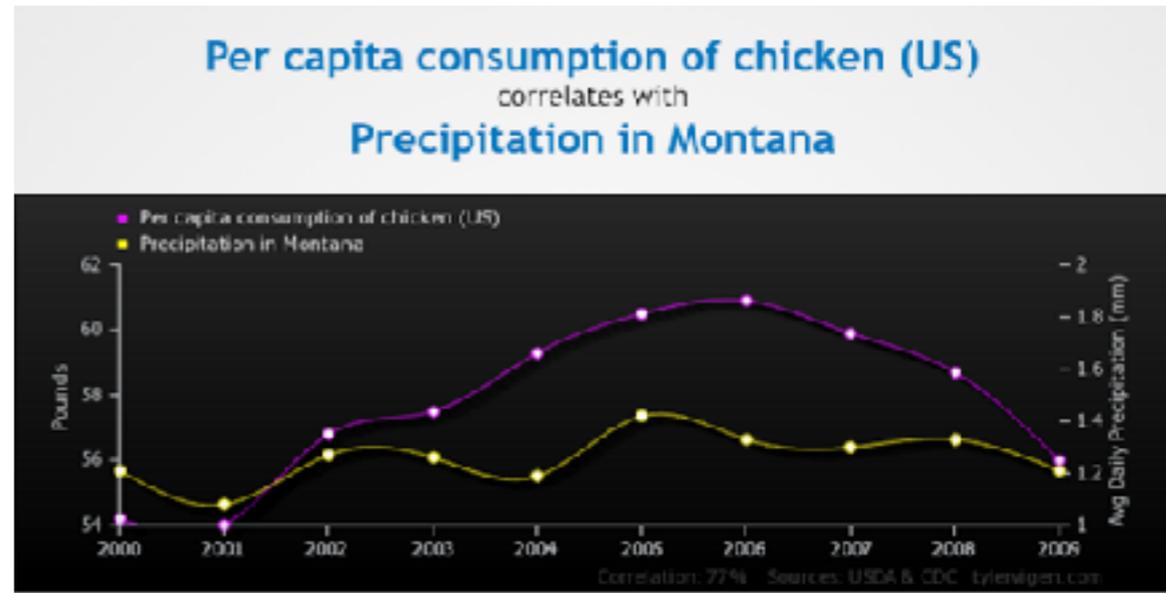
La correlazione tra due osservazioni non è indice di causalità

La correlazione implica la causalità

È un principio statistico fondamentale e significa che il fatto che due fenomeni si presentino contemporaneamente (o abbiano qualche legame tra loro) non implica che uno sia la causa dell'altro.

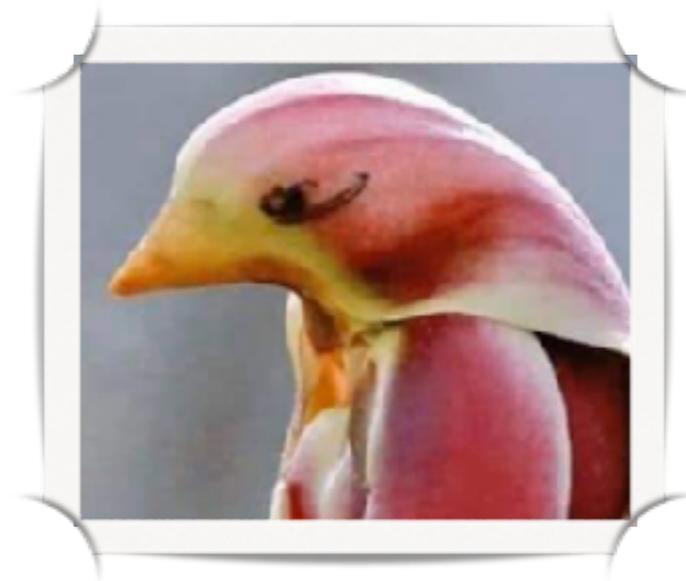
1808 - Uno fra gli errori più comuni, è prendere ciò che segue a un avvenimento per la sua conseguenza.

Pierre-Marc-Gaston de Lévis - Massime e riflessioni,



TAKE HOME MESSAGE:

La realtà soggettivamente percepita è diversa dalla oggettività scientificamente dimostrabile.



.....

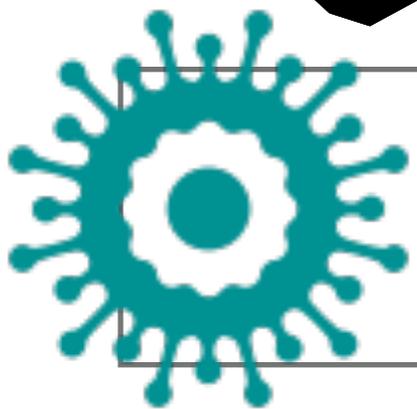
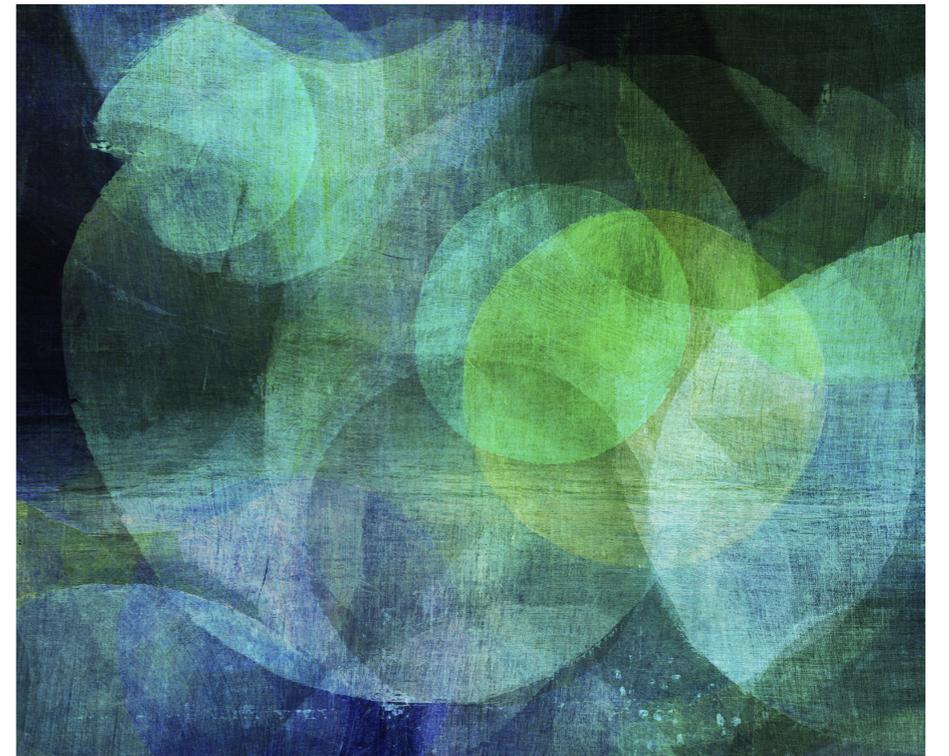
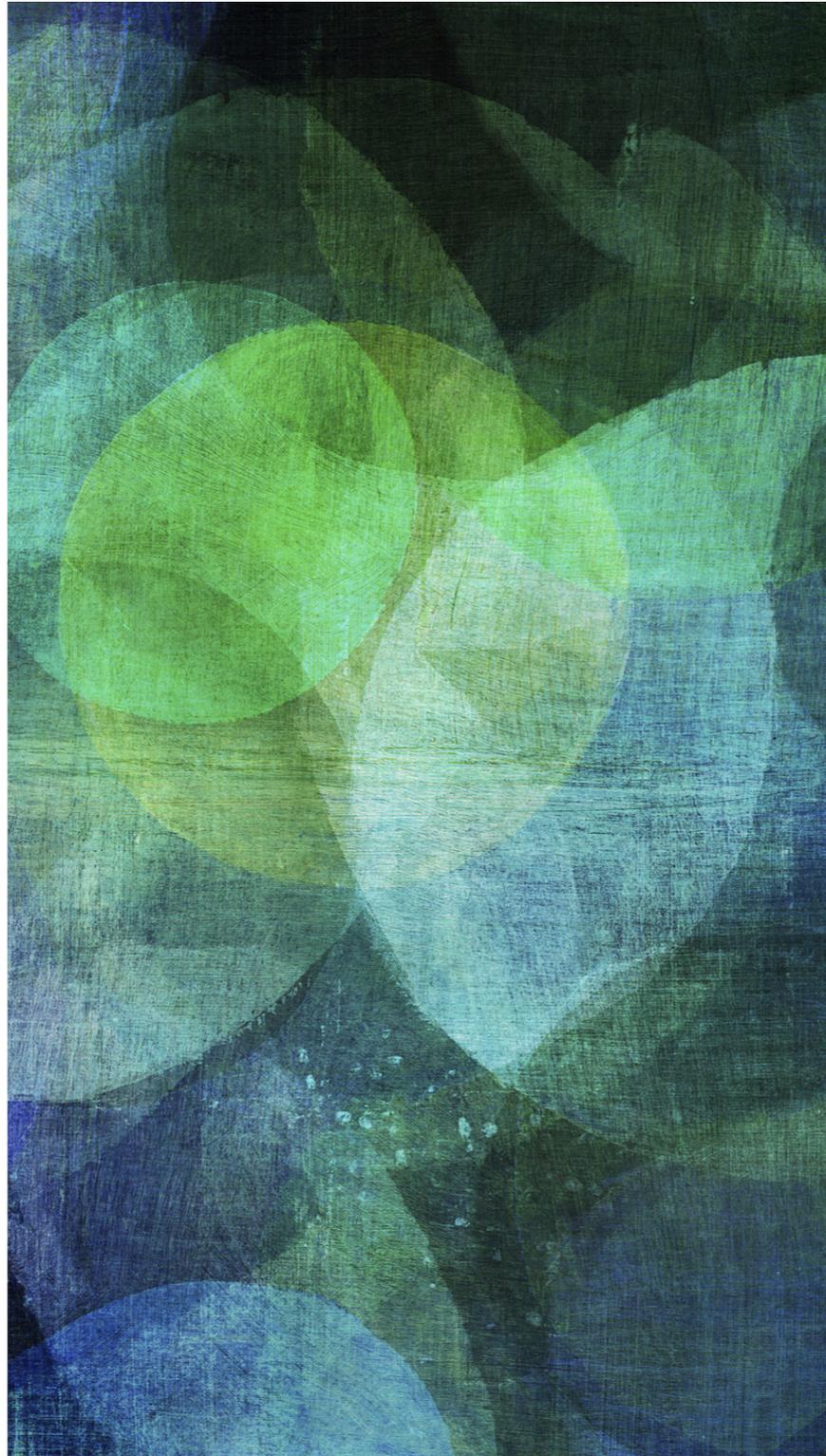
E' necessario approcciare le
problematiche con metodo
scientifico e correttezza
intellettuale.



Guyline Labonté 28 agosto alle ore 17:39 · 🌐

👍👎❤️ 44

Commenti: 6 Condivisioni: 1



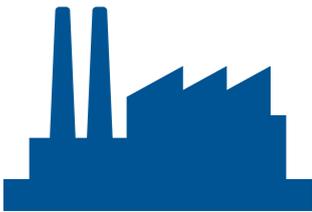
DOMANDE??

EVOLUZIONE STORICA DELLA DISCIPLINA

.....
La valutazione della qualità ambientale nasce legata al concetto di salubrità per l'uomo e successivamente si estende alla conservazione dell'ecosistema.

Le valutazioni sono effettuate attraverso il **monitoraggio di sostanze chimiche** e **patogeni** di stretto interesse per la salute umana.

L'APPROCCIO CHIMICO: VANTAGGI E LIMITI



- Analisi quantitativa
- Metodi standard
- Ripetibilità elevata
- Facile leggibilità per non addetti ai lavori
- Applicabilità di standard di legge



Ad oggi sono note più di 67 milioni di sostanze organiche e inorganiche

Oltre 10.000 nuove molecole immesse nel mercato ogni anno

(<http://www.cas.org>)



- Fornisce informazioni solo sulle sostanze chimiche ricercate
- Non consente di evidenziare la biodisponibilità di quanto misurato (es. metalli in aree anomale geologicamente)
- Non descrive gli effetti biologici
- Non fornisce indicazioni sugli effetti a livello di ecosistema
- Non fornisce indicazioni sui tempi di risposta degli ecosistemi





Probabilità di andare incontro agli effetti avversi che la sostanza può provocare, in seguito ad esposizione

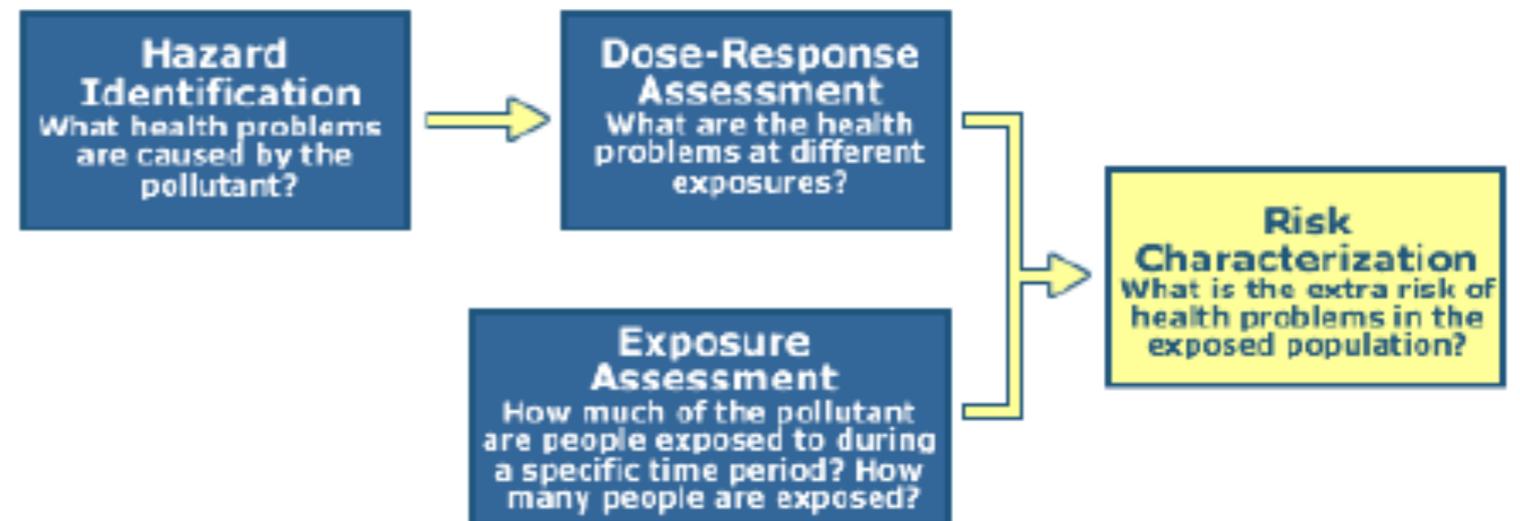
In ecotossicologia il rischio è la stima degli effetti di un agente chimico sulla salute degli organismi viventi nonché sui beni naturali e sulla qualità di vita della popolazione

Caratteristica intrinseca della sostanza

Per la caratterizzazione del rischio chimico è necessario distinguere due obiettivi:

1. Rischio per la salute umana (sanitario)
2. Rischio per i sistemi naturali (ambientale)

The 4 Step Risk Assessment Process



I quattro passi della caratterizzazione del rischio sanitario secondo la US-EPA.

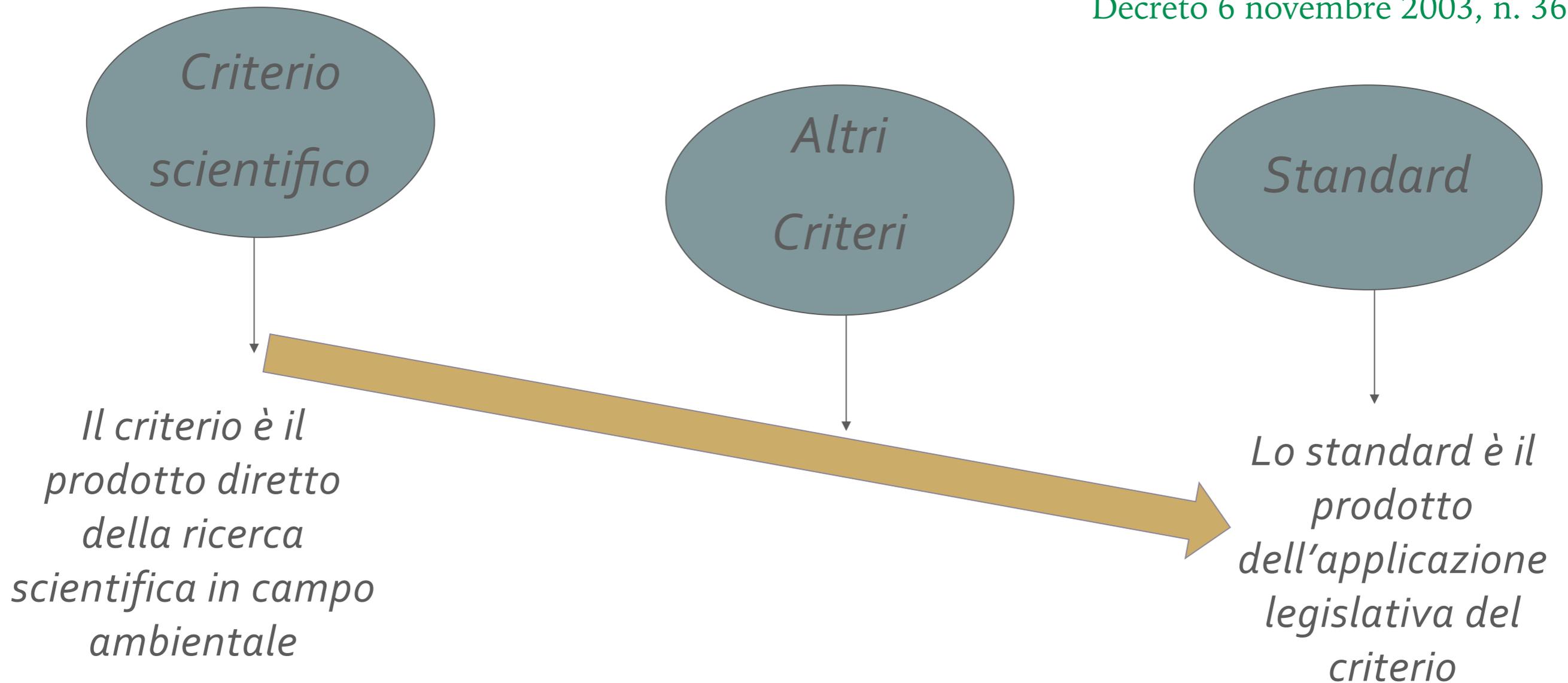
Pericolo e rischio sono definiti anche dalla art. 2, lettera r e lettera s del D.Lgs. 81/08.

Fonte:<http://www.epa.gov/risk/risk-characterization.htm>.

Come stimare l'impatto dell'uomo sull'ambiente?

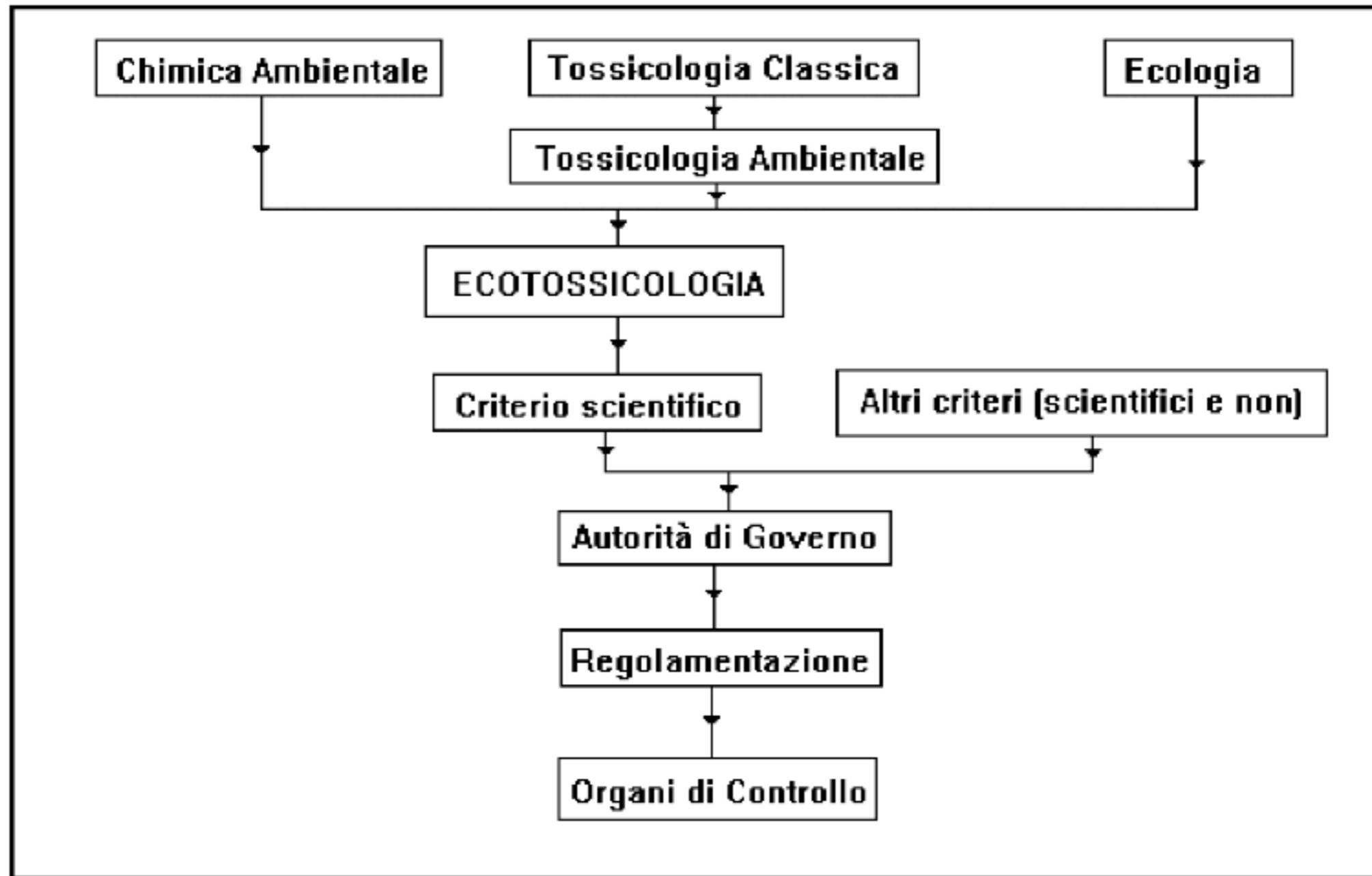
Criteria vs Standard, definizione

Standard di Qualità per le
Sostanze Pericolose
Decreto 6 novembre 2003, n. 367



La definizione di un criterio è materia scientifica, l'applicazione degli standard è materia governativa

COME SI PONE L'ECOTOSSICOLOGIA IN QUESTO CONTESTO?



- Componenti e funzioni dell'Ecotossicologia. Da Bacci e Vighi, 1998.

SFASAMENTI TEMPORALI TRA STANDARD E CRITERI SCIENTIFICI

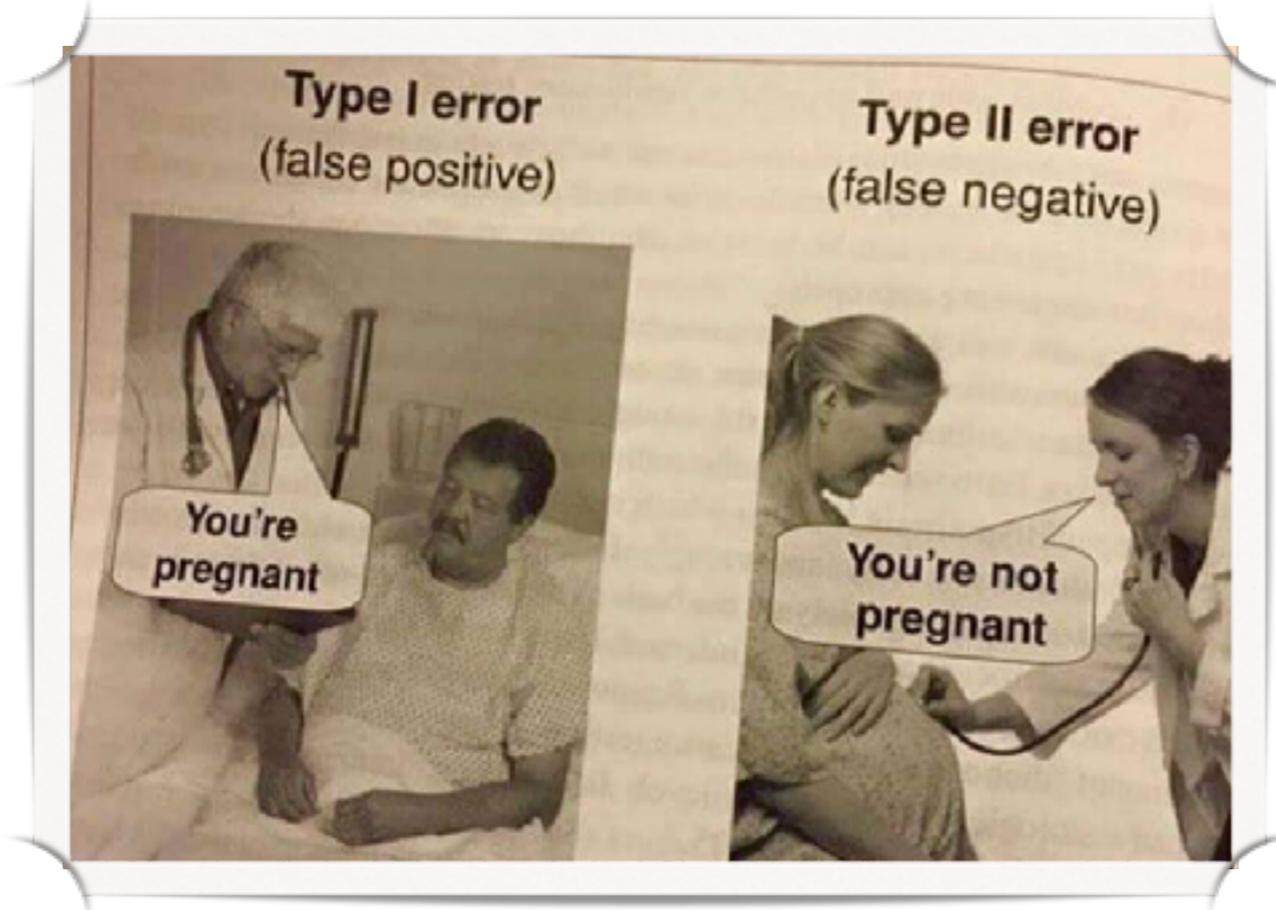
La normativa arriva prima dell'elaborazione di criteri scientifici

National Environmental Policy Act, NEPA, approvato nel 1969 e in vigore dal 1970, ha introdotto la Valutazione d'Impatto Ambientale (Environmental Impact Assessment, EIA) prima di disporre da parte delle agenzie federali (EPA) dei dati necessari ad elaborare i criteri scientifici di riferimento per le valutazioni.

La normativa arriva con eclatante ritardo rispetto ai criteri scientifici

Questo tipicamente è il caso più frequente: Nove anni di ritardo tra la pubblicazione delle linee guida ISPRA (2007) e il D.Lgs. 173/2016 e venti anni di ritardo tra questo adeguamento normativo e il precedente DM del gennaio 1996.

Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE), incluso con grande ritardo nell'elenco ufficiale delle sostanze pericolose dell'Unione Europea; Ritardi nei recepimenti dei Regolamenti Europei da parte degli stati membri (es. MSFD, target di buono per il 2020).



SFASAMENTI CONCETTUALI TRA STANDARD E CRITERI SCIENTIFICI

La octaclorodibenzo-p-diossina (OCDD) è ubiquitaria e persistente, ma di scarso significato tossicologico.

Inoltre, la OCDD che si ritrova, ad esempio, nei sedimenti di sistemi acquatici può derivare da una sintesi de novo in atmosfera a partire da vapori di pentaclorofenolo (Baker e Hites, 2000).

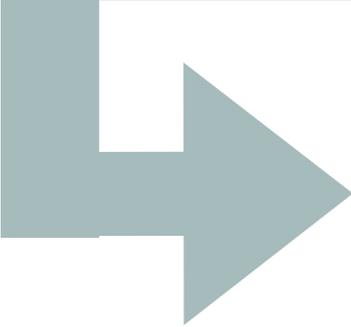
Nonostante questo nella norma si è deciso di adottare, per tale sostanza, un Fattore di Equivalenza Tossica rispetto alla "Diossina di Seveso" (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina) **dieci volte superiore a quello indicato dalla WHO nella riunione di esperti di Stoccolma (Svezia) nel giugno 1997** (10^{-3} contro 10^{-4} ; van Leeuwen et al., 2000; confermato nel Decreto 8 novembre 2010 di cui sopra).

EVOLUZIONE DELLA SENSIBILITÀ SOCIALE

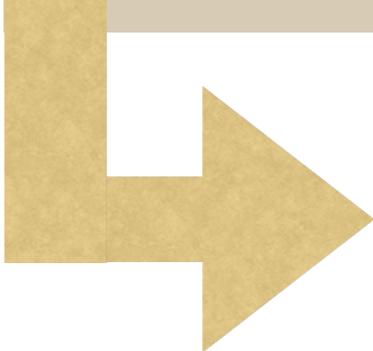
Assenza di regole per gli scarichi

Anni del boom economico del dopoguerra ('50) fino alla fine degli anni '70.

L'approccio normato è basato su standard, liste di contaminanti preconfezionate e standard di riferimento rigidi.



Legge Merli per la tutela delle acque dall'inquinamento (1976)



Oggi...

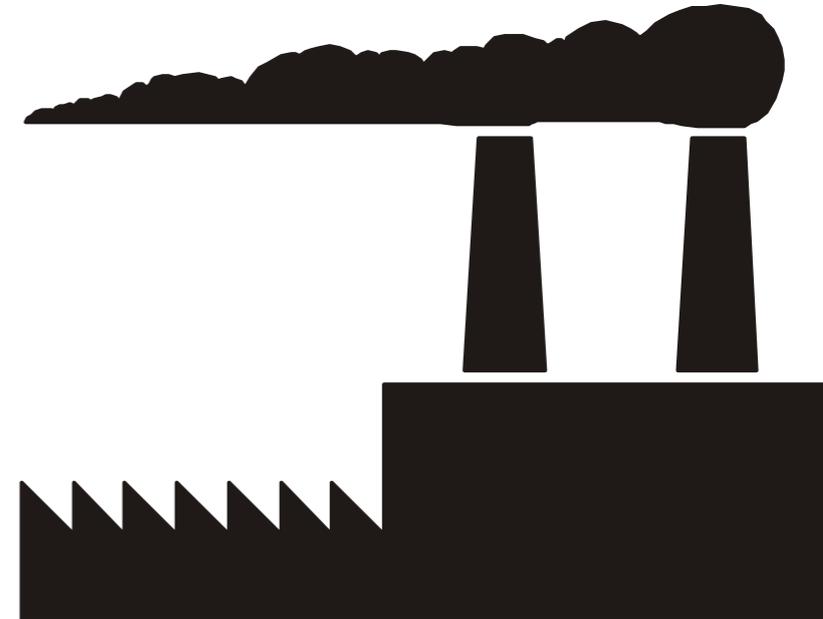
Normativa in continua evoluzione, produzione elevata di Regolamenti a livello comunitario e recepimenti nazionali e regionali che spesso complicano il quadro normativo.

I limiti di questo approccio sono facilmente evidenziabili se si considera il contesto ricevente...

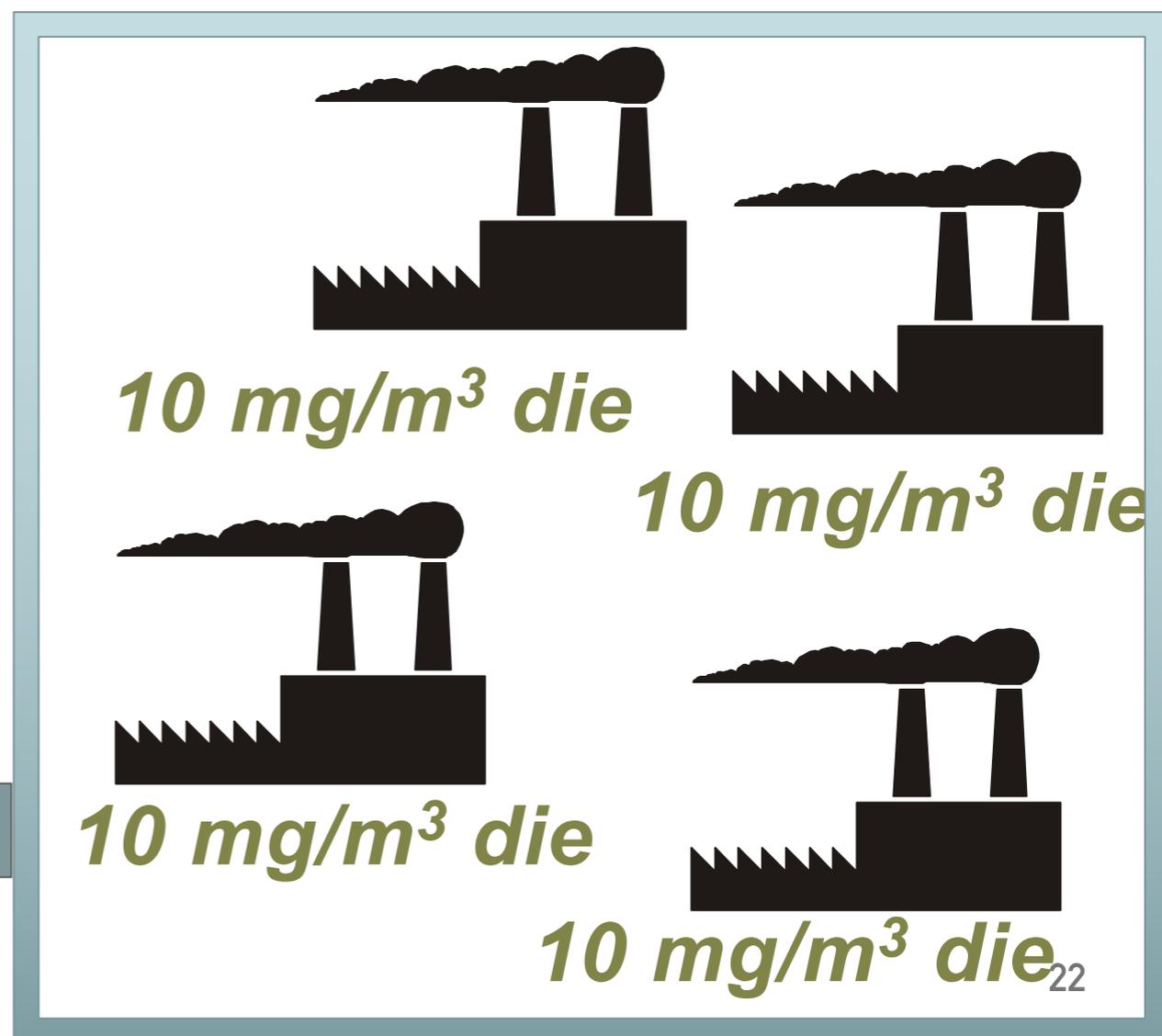
Non descrive gli effetti a livello di ecosistema e nel rispetto dello standard di emissione possono sussistere situazioni ambientali di inaccettabilità

Numerosi scarichi dello stesso tipo si sommano nel sistema ricevente

40 mg/m³ die



10 mg/m³ die



10 mg/m³ die

10 mg/m³ die

10 mg/m³ die

10 mg/m³ die₂₂

RICERCA DI CONTAMINANTI DA LISTE “PRECONFEZIONATE”

Le liste preconfezionate dalla norma per la selezione delle molecole di interesse **sono “comode” ma problematiche.**

Lo studio della contaminazione deve essere contestualizzato: zone urbane, agricole, industriali risentiranno diversamente della contaminazione locale, ma in ugual misura di quella a medio e lungo raggio (global pollution).

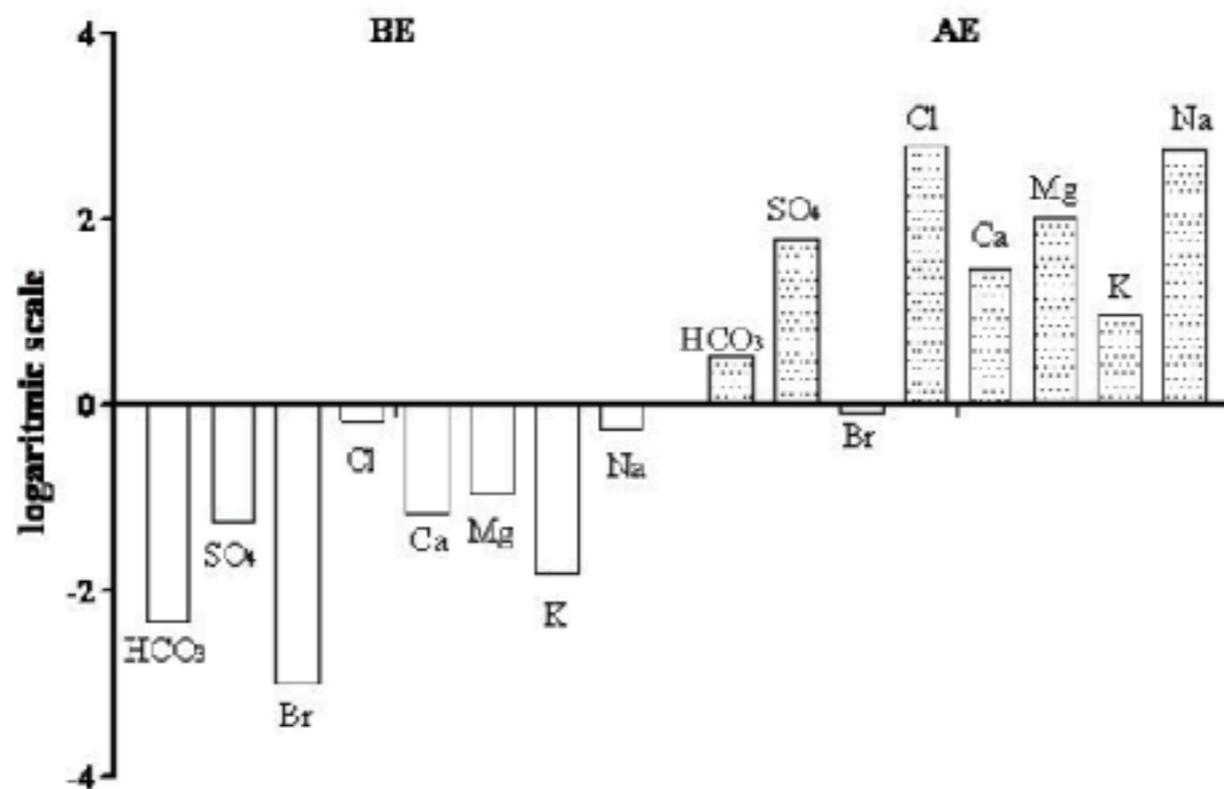
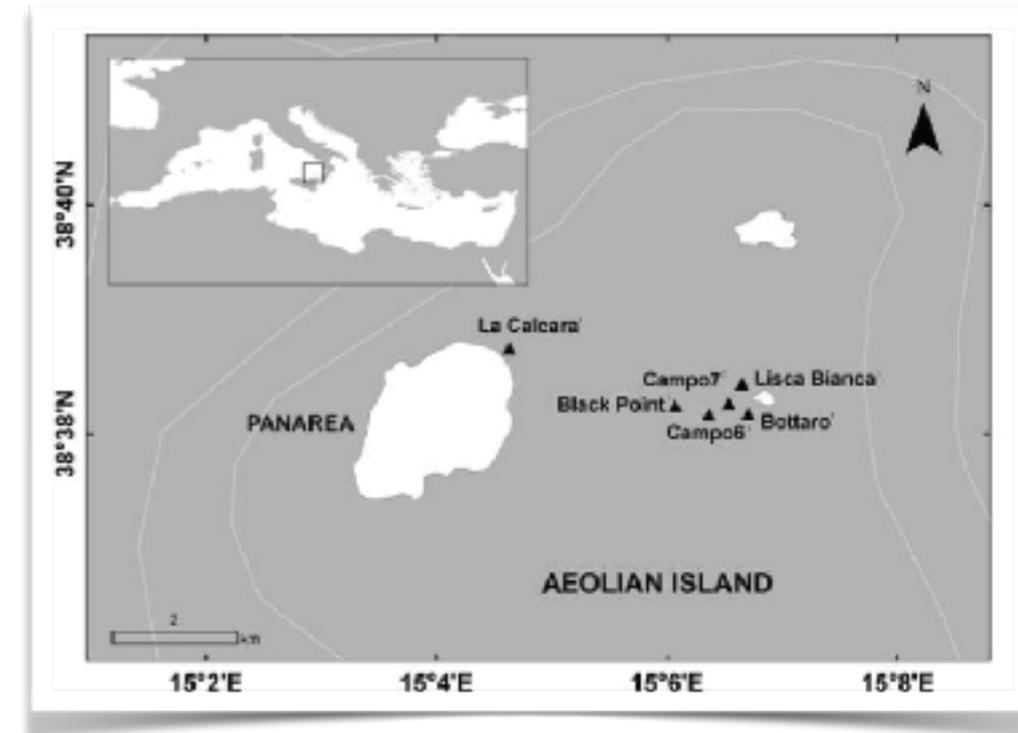
Per questo è necessario definire livelli di fondo su base locale per elementi naturali e per elementi accelerati dall'azione umana.

Il rischio che si corre è quello di trovare ovunque gli stessi contaminanti, con meraviglia, dimenticando che si tratta, magari, di contaminanti globali (Bacci, 1994).

La rimozione o il controllo di questi ultimi richiede tempi piuttosto lunghi, legati all'inerzia del sistema (Bacci 2011).

I sistemi naturali acquatici soffrono anche per l'immissione di sostanze non tossiche: si pensi al potere modificante di un eccesso di nutrienti.

EVENTI PAROSSISTICI STRAORDINARI: IL CASO DELLE EOLIE



Available online at www.elsevier.com/locate/isci
SciVerse ScienceDirect
 Procedia in Earth and Planetary Science 4 (2011) 1–20

Procedia
 Earth and Planetary Science

Research in Shallow Marine and Fresh Water Systems

Temporal trends and matrix-dependent behaviors of trace elements closed to a geothermal hot-spot source (Aeolian Archipelago, Italy)

Monia Renzi^{1*}, Teresa Romeo², Cristiana Guerranti², Guido Perri², Francesco Italiano², Silvano E. Focardi², Valentina Esposito³, Franco Andoleno⁴

Environ Monit Assess
 DOI:10.1016/j.envmon.2011.02.024

Alteration of potential harmful elements levels in sediments and biota from the central Mediterranean Sea (Aeolian Archipelago) following an episode of intense volcanic activity

Franco Andoleno · Teresa Romeo · Monia Renzi · Cristiana Guerranti · Guido Perri · Pierpaolo Consoli · Fabrizia Perza · Silvano Emanuele Focardi

Fig. 2. Average levels of each chemical water descriptor in stations from the Ants of Panarea islets. Data are expressed as logarithmic transformation of measured concentration originally expressed as μgL^{-1} . Data are grouped as average before (BE, white lines) and averages immediately after (AE, grey lines) the paroxysmal activity. HCO_3^- = carbonic acid, SO_4^{2-} = sulfate, Br = bromine, Cl = chlorine, Ca = calcium, Mg = magnesium, K = potassium, Na = sodium.

EVENTI PAROSSISTICI STRAORDINARI: IL CASO DELLE EOLIE

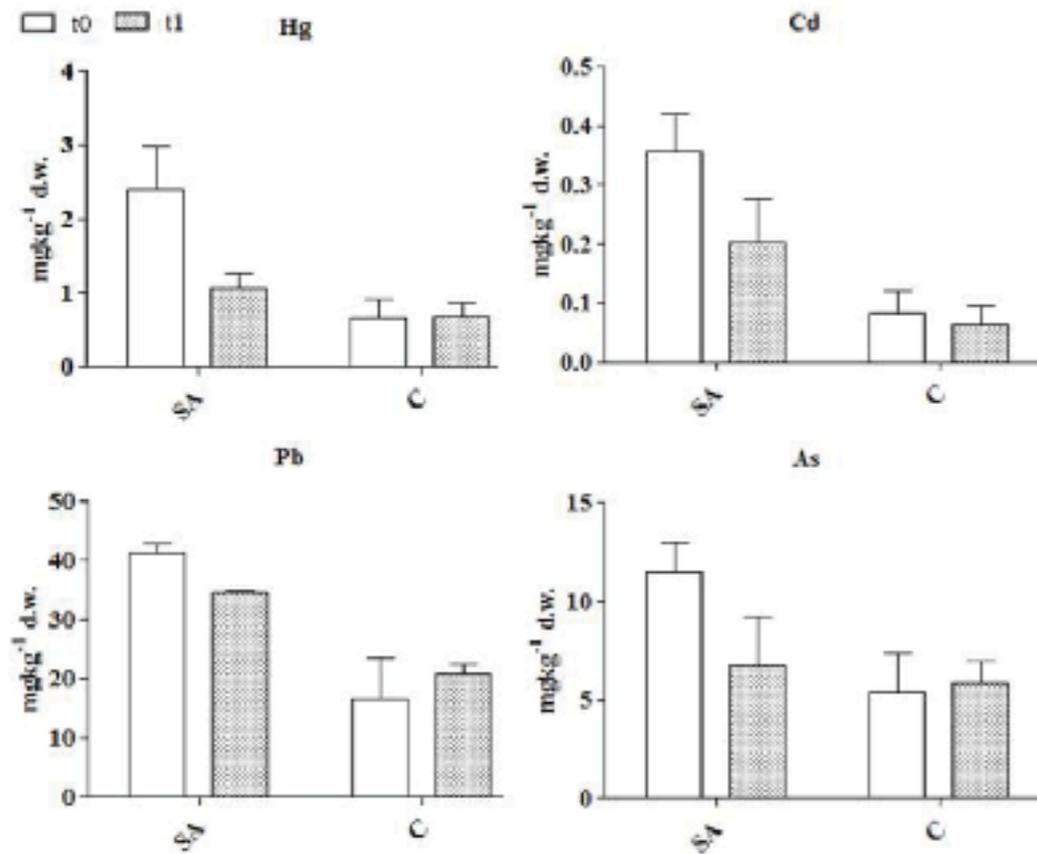
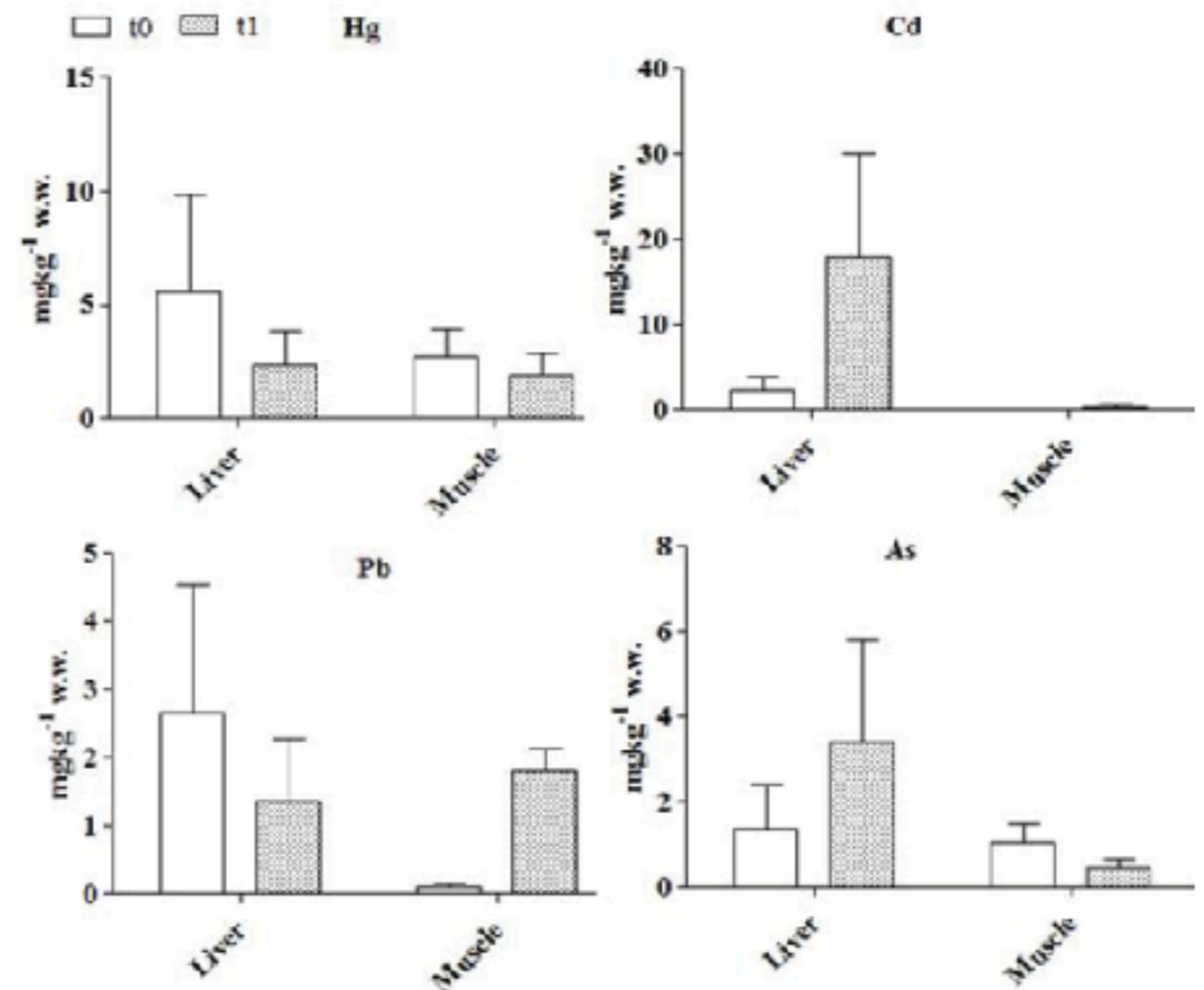


Fig. 6. Average trace element levels measured in *C. compressa*. Average (+ standard deviation) data are grouped both by the factor location (two levels, fixed: study area, SA versus controls, C), and time from the event (two levels, fixed and orthogonal: T₀ after the event, November 2002 versus T₁ ten months after the event, September 2003). Hg = Mercury, Cd = Cadmium, Pb = Lead, As = Arsenic, d.w. = dry weight



AREE GEOLOGICAMENTE ANOMALE

Baseline levels of trace elements in coastal sediments from the central Mediterranean (Tuscany, Italy)

Menia Renzi^a, Nicola Bigongiari^b and Silvano E. Focardi^a



Table 6 Linear regression ($0.50 < r < 0.70$)

Equation ($y = ax(\pm SD) + b(\pm SD)$)	CAi	Cas	r
Hg = $0.073(\pm 0.006)Fe - 0.050(\pm 0.011)$	0.062	0.085	0.63
Ni = $13.84(+1.02)Fe + 20.98(+2.13)$	11.8	15.9	0.63
Cr = $1.204(\pm 0.08)Li + 25.39(\pm 3.52)$	1.05	1.36	0.67
As = $0.771(\pm 0.07)Li + 1.187(\pm 3.100)$	0.63	0.91	0.55

Mathematical regressions ($y = ax + b$) and associated linearity (r) for a significance level of $p < .01$. CAi and Cas represent lower and upper thresholds associated to the values of the angular coefficient (a) for trace elements reported in linear regression modelled.

La presenza di elevati livelli di alcune sostanze tossiche note, magari presenti per anomalie naturali in forme non biologicamente attive, può portare ad attribuire a queste effetti dovuti ad altri fattori, non considerati.

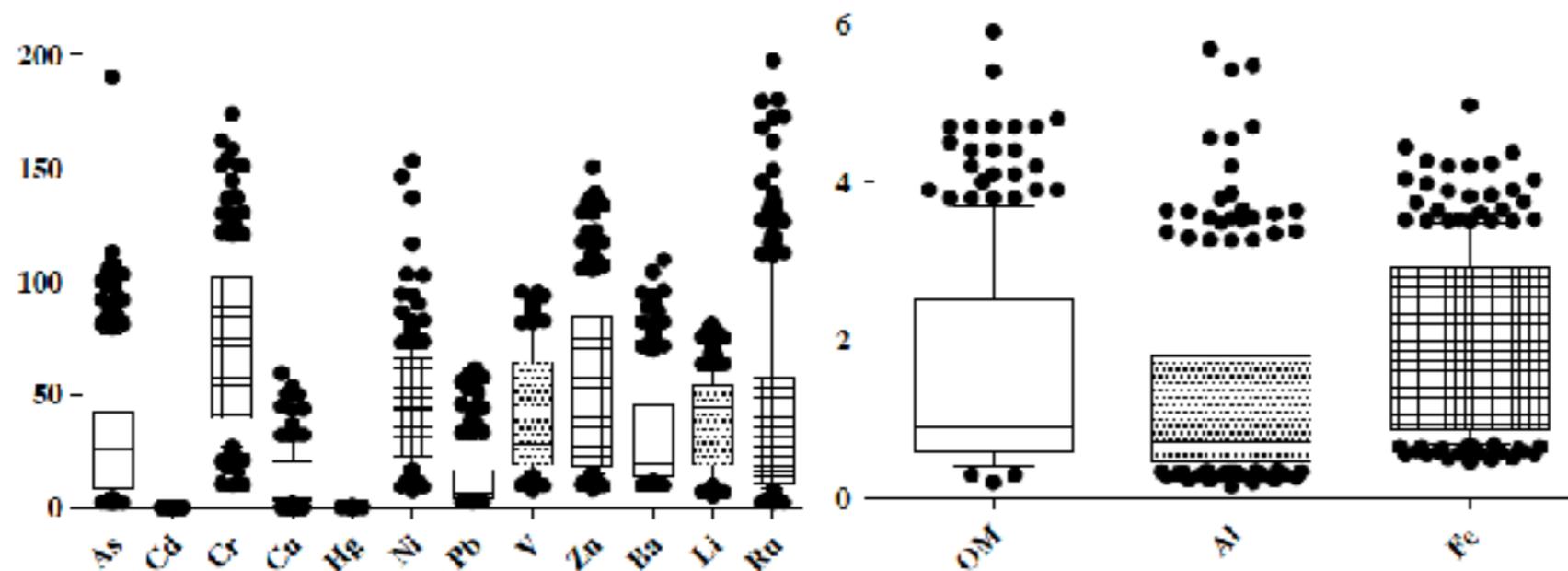
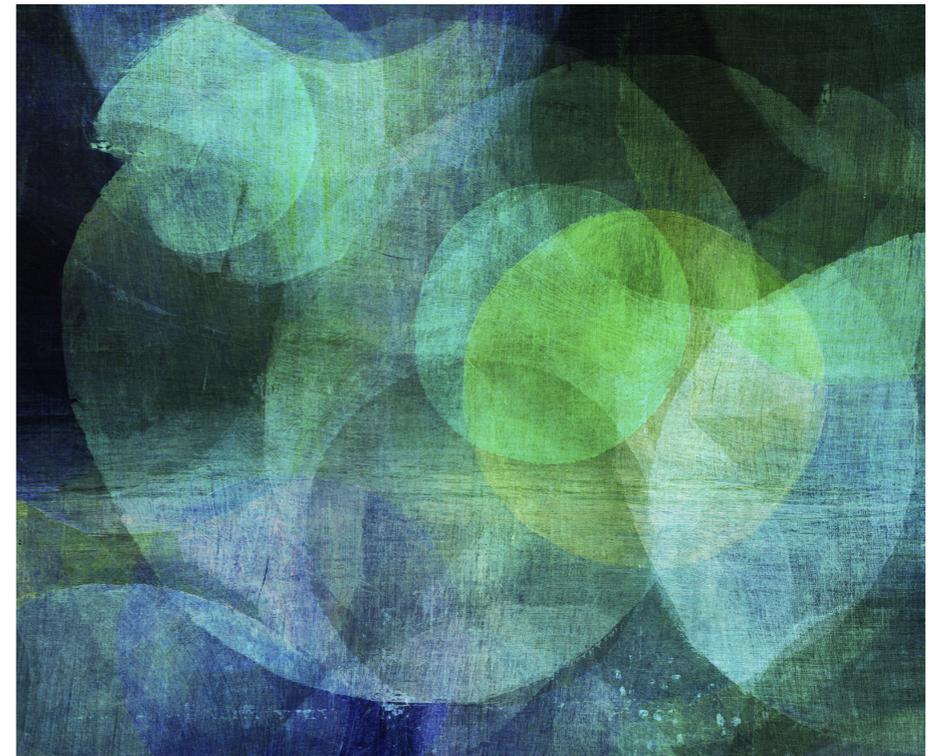
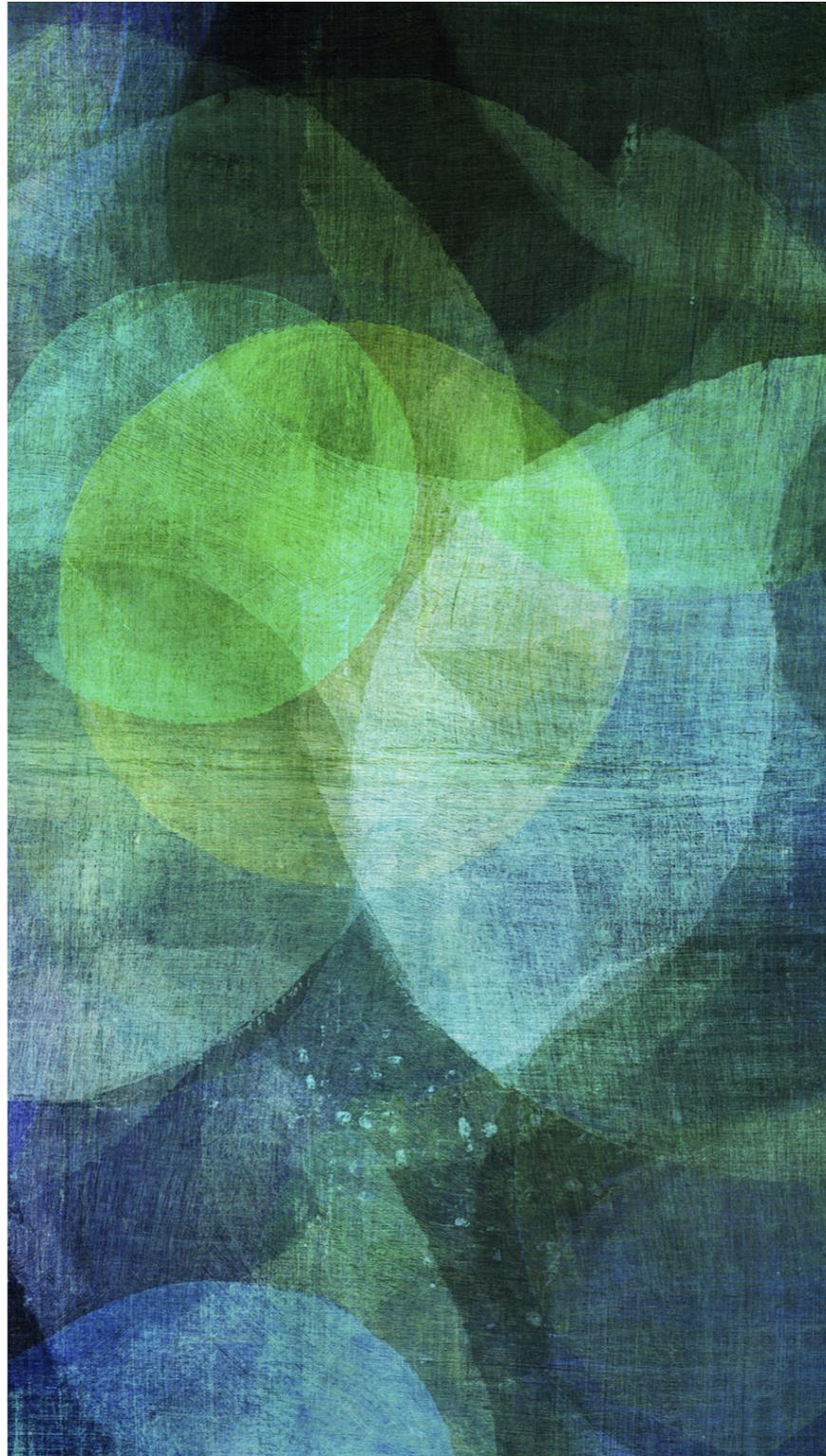


Figure 2. Box-whiskers.

Note: Data expressed as $mg\ kg^{-1}\ d.w.$ with the exception of OM, Al, and Fe expressed as $\% d.w.$.



DOMANDE??

DA DOVE TUTTO HA AVUTO INIZIO...

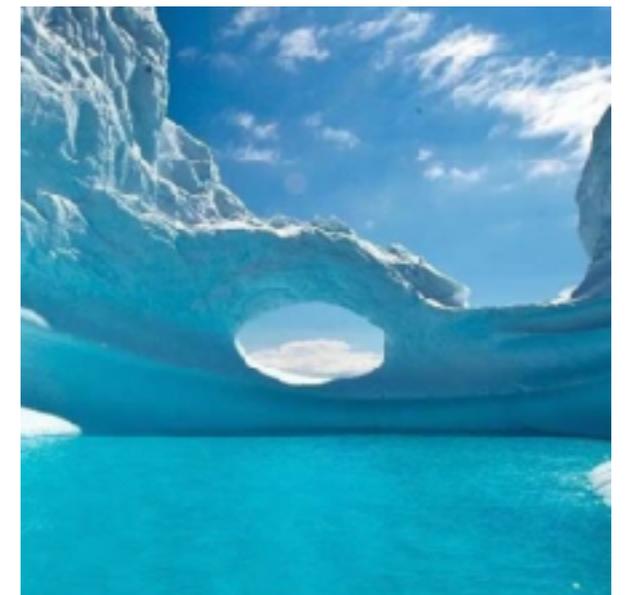
DDT
Primavera
Silenziosa

Cadmio in
Giappone
Morbo Itai-Itai

Problemi significativi con sostanze chimiche...
si ha evidenza che gli approcci retrospettivi non sono sufficienti a contenere i disastri...

Mercurio
Caso Minamata
Giappone

POPs
Antartide



LESS “WHERE?” ... MORE “HOW?” AND “WHY?” ...

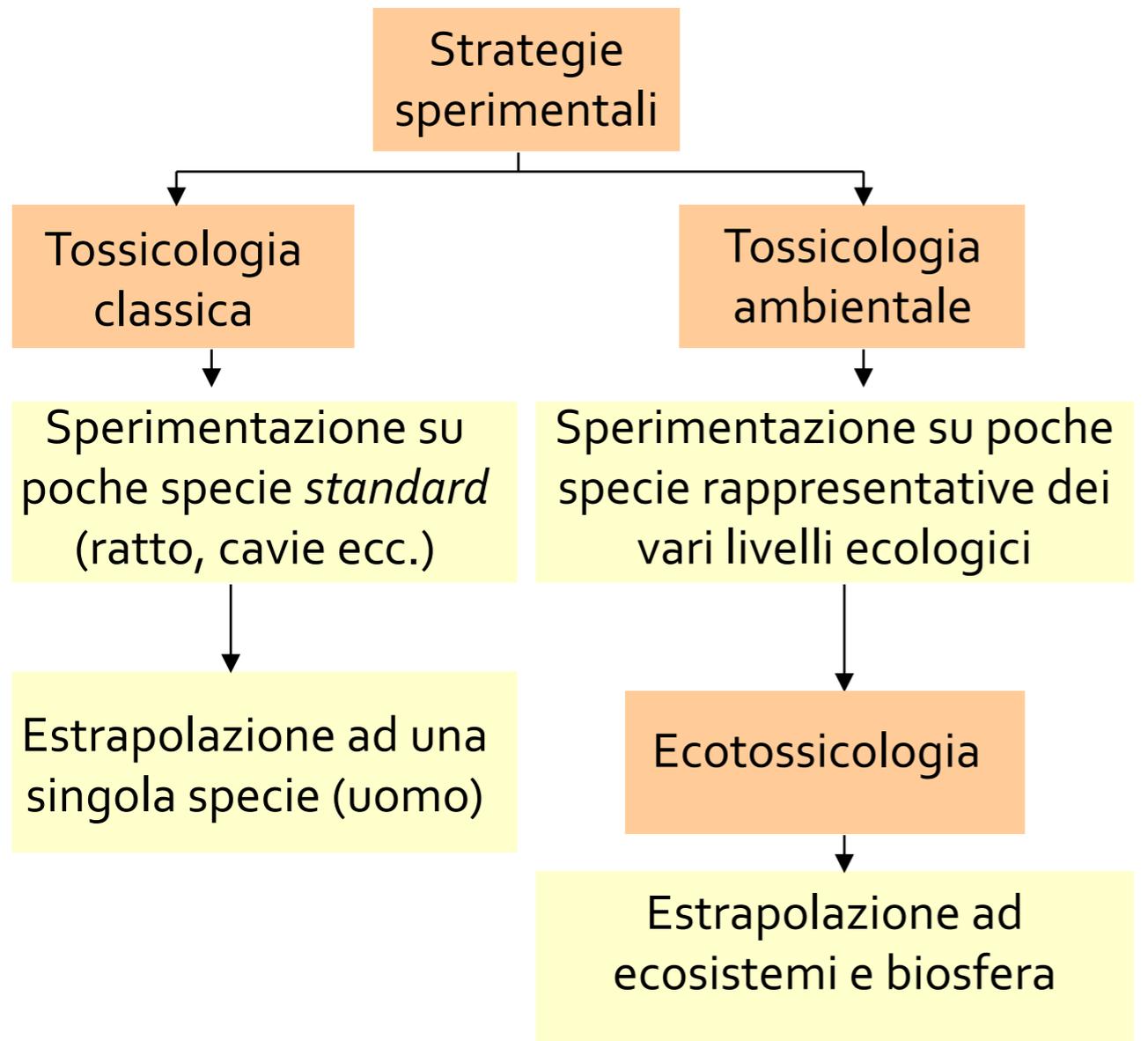
David A. Wright, 1985



...LA NASCITA DELL'ECOTOSSICOLOGIA

EVOLUZIONE STORICA DELLA DISCIPLINA

Tossicologia classica, tossicologia ambientale ed ecotossicologia



L'ecotossicologia ha il campo di azione più ampio

L'ecotossicologia combina due argomenti molto diversi: l'ecologia (lo studio scientifico delle interazioni che determinano la distribuzione e l'abbondanza degli organismi, Krebs 1985) e la tossicologia (lo studio degli effetti nocivi delle sostanze sugli organismi viventi, generalmente l'uomo).

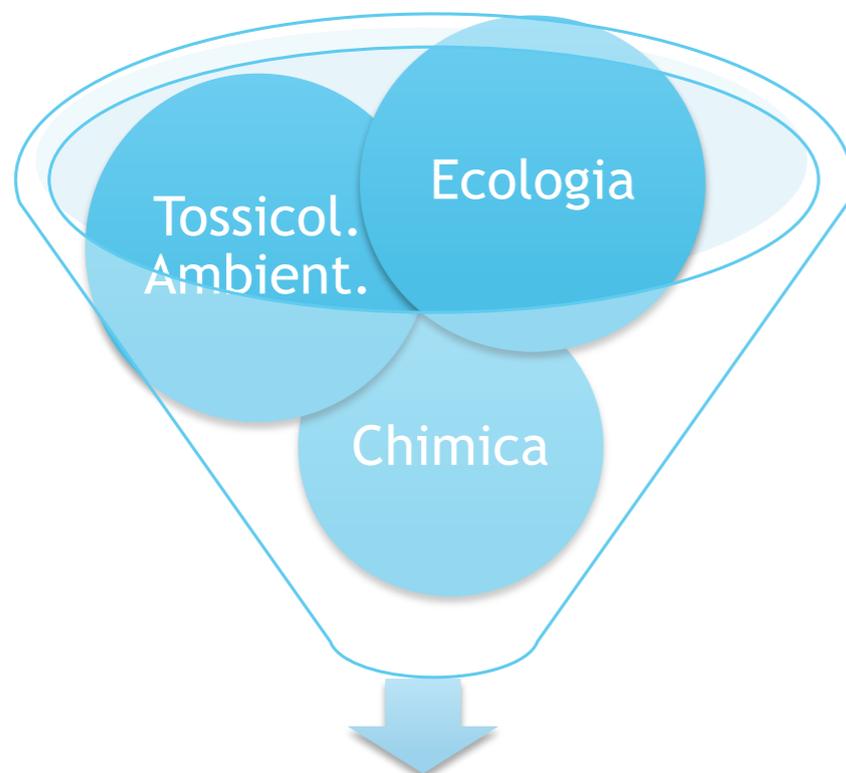
In tossicologia gli organismi rappresentano il limite dell'indagine mentre l'ecotossicologia aspira a valutare l'impatto delle sostanze chimiche non solo sugli individui ma anche sulle popolazioni e sugli interi ecosistemi.

Il fine dell'ecotossicologia è la conservazione dell'integrità funzionale degli ecosistemi

LA NASCITA DI UN NUOVO APPROCCIO: L'ECOTOSSICOLOGIA

Allo fine degli anni '60 si è acquisita consapevolezza riguardo al fatto che la conservazione della specie umana non può prescindere dalla conservazione dell'integrità funzionale degli ecosistemi

Si hanno evidenze che gli approcci tradizionali basati sulla protezione della salute umana e sul monitoraggio chimico non sono adatti alla tutela dell'ambiente



Ecotossicologia

Nasce l'ecotossicologia come integrazione trasversale di discipline classiche per perseguire più efficacemente la tutela dell'ambiente

(René Truhaut, 1969)

OBIETTIVI DELL'ECOTOSSICOLOGIA (FORBES E FORBES, 1994)

- Ottenere dati per la valutazione del rischio e la gestione ambientale.
- Soddisfare i requisiti legali per lo sviluppo e il rilascio di nuove sostanze chimiche.
- Sviluppo di principi empirici o teorici per migliorare la conoscenza del comportamento e degli effetti delle sostanze chimiche nei sistemi viventi

Durante i primi anni, i principali strumenti di Tossicologia Ambientale erano: rilevamento di residui tossici nell'ambiente o in singoli organismi e test per la tossicità delle sostanze chimiche su animali diversi dall'uomo. Tuttavia, è stato un grande salto di comprensione da un animale sperimentale a un ambiente complesso e multivariato e il soggetto di ECOTOSSICOLOGIA sviluppato dalla necessità di misurare e prevedere l'impatto degli inquinanti su popolazioni, comunità e interi ecosistemi piuttosto che sugli individui. È in corso un dibattito sull'ambito esatto e sulla definizione di ecotossicologia.

La definizione più semplice finora trovata è che l'ecotossicologia è "lo studio degli effetti nocivi delle sostanze chimiche sugli ecosistemi" (Walker et al, 1996)

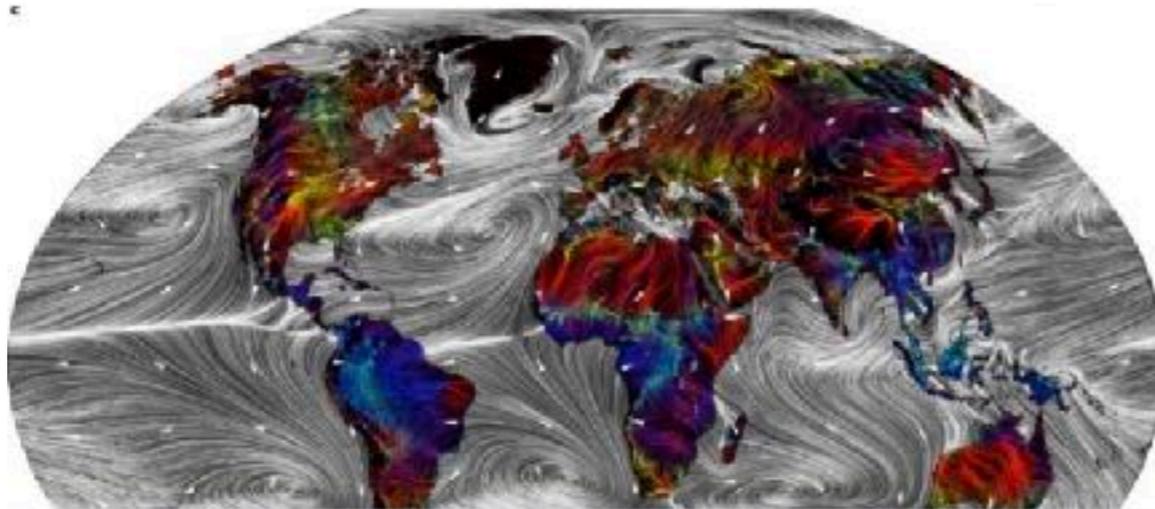
Una definizione più completa di Ecotossicologia viene da Forbes & Forbes 1994 "il campo di studio che integra gli effetti ecologici e tossicologici degli inquinanti chimici su popolazioni, comunità ed ecosistemi con il destino (trasporto, trasformazione e degradazione) di tali inquinanti nell'ambiente".

VERSO UNA DEFINIZIONE INTEGRATA DI ECOTOSSICOLOGIA

- ❖ L'ecotossicologia è una disciplina rivolta allo studio del destino e degli effetti dei contaminanti nell'ambiente, con metodo scientifico, ovvero non limitandosi all'osservazione ed alla descrizione dei fenomeni, ma elaborando anche previsioni



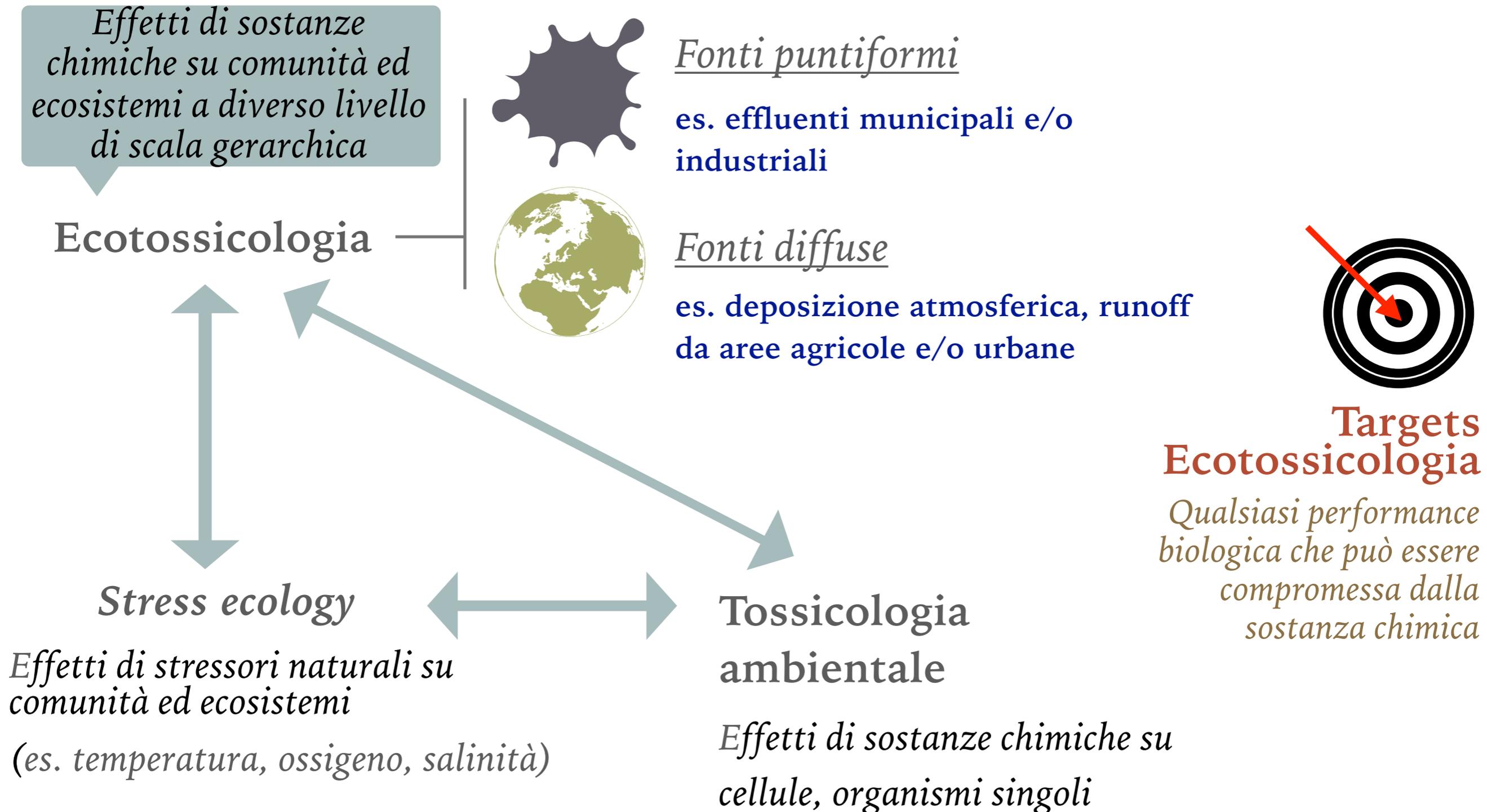
Senza previsione non c'è Scienza: si possono solo raccontare delle "storie naturali" (Bacci, 2011).



NATURE.COM

Global wind patterns and the vulnerability of wind-dispersed species to climate change

COSA STUDIA L'ECOTOSSICOLOGIA?



MACROAREE DI APPLICAZIONE DELL'ECOTOSSICOLOGIA

- 1) Valutazione dei rischi associati all'immissione sul mercato di nuovi prodotti (approccio a monte);
- 2) Misura, sul campo, di danni a carico degli organismi viventi in presenza di fenomeni di inquinamento (approccio a valle);
- 3) Misura dello scostamento dalla naturalità di ambienti più o meno compromessi, anche in totale assenza di fenomeni di tossicità, finalizzata alla tutela della qualità e dell'integrità delle risorse naturali.

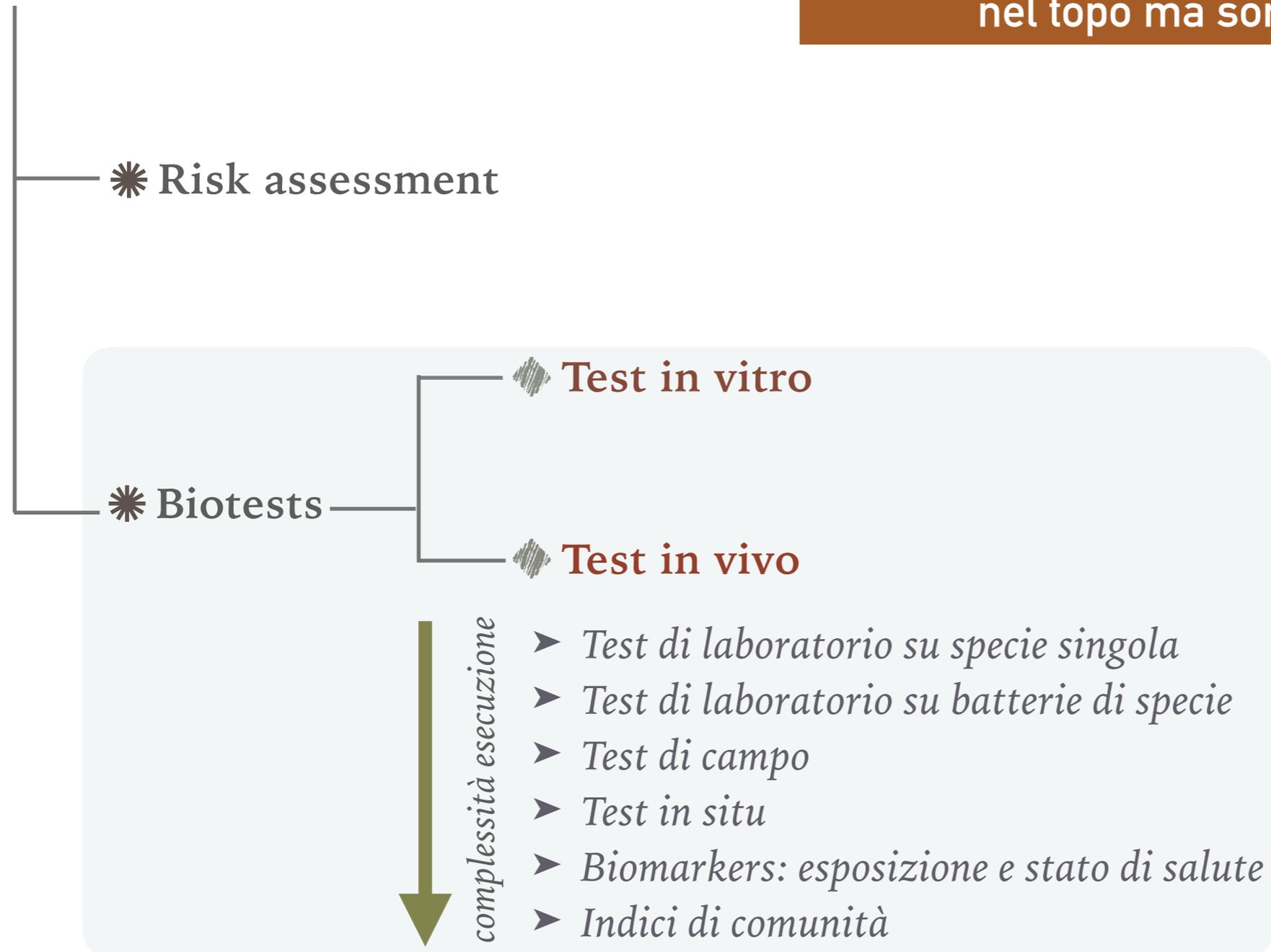
(Bacci e Caneschi, 2008)



DI QUALI STRUMENTI DI INDAGINE DISPONE OGGI?

ATTENZIONE: In alcuni casi il modello di laboratorio non simula perfettamente altre specie. Ad esempio alcuni tumori di esposizione al benzene non esistono nel topo ma sono riportati nell'uomo.

Approcci attuali





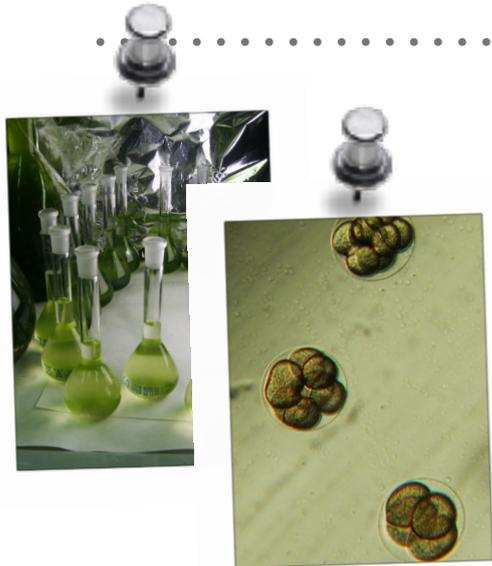
Biotests: in vitro tests

Esempi di test in vitro promettenti e sostanze chimiche alle quali rispondono

Effect	<i>In vitro</i> Test	Responsive to	Standard Protocol /Reference
Aryl hydrocarbon (Ah) receptor (in) activation	Recombinant cell based assays, e.g., H4IIB luc, AhR CALUX, DR-CALUX®	Dioxins, coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs), poly aromatic hydrocarbons (PAHs)	[21] BioDetection Systems BV, Amsterdam, NL, [28] (US EPA, Method 4435, 2007) [29]
(Anti-) Estrogenicity	(anti-) Yeast estrogen screen (YES)	Natural and synthetic estrogens, bisphenol A, nonylphenol, phthalates (anti), and others.	[23]
	Cell based reporter gene assays, such as T47D, Luc, T47D-KBluc, ER CALUX®		[30] [31] [21] BioDetection Systems BV, Amsterdam, NL.
	Cell proliferation assay (MCF 7, E screen)		[32]
(Anti) Androgenicity	(anti) yeast androgen screen (YAS)	Natural and synthetic androgens, e.g., androstenedione	[33]
	Cell-based reporter gene assays, such as AR-CALUX®		[21] BioDetection Systems BV, Amsterdam, NL

Effect	<i>In vitro</i> Test	Responsive to	Standard Protocol /Reference
Thyroid hormone disruption	Transthyretin (TTR)-binding assay	Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), PCBs, and other halogenated phenols, pesticides	[34]
	Cell based reporter gene assays, such as TR CALUX®		[21] BioDetection Systems BV, Amsterdam, NL
	Cell proliferation assay (T-Screen)		[35]
Genotoxicity/ DNA damage	Ames assay	Heavy metals, pesticides, PAHs and others	ISO 16240, 2005, DIN 38415-3, 1999
	UmuC-assay		ISO13829, 2000
	Micronucleus assay		ISO 21427-2, 2006
Neurotoxicity	Inhibition of acetylcholinesterase	Organophosphate/ carbamate insecticides	DIN 38415-1 [36]
Inhibition of Photosynthesis	Combined algae test	Herbicides	[37]
Cytotoxicity	Microtox (luminescent bacteria) assay	Unspecific	ISO 11348-3 [37]
	Cell viability assays such as MTT or neutral red staining	Unspecific	[38] [39]

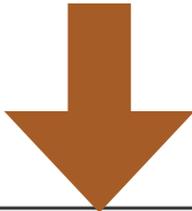
Biotests: in vivo tests



Gli organismi sono esposti a matrici contaminate o campioni reali

Test con singole specie

Test con batterie multispecie



Due applicazioni di routine:
 -) test di sostanze singole per la registrazione REACH
 -) test di qualità ambientale

Organism	Exposure period	Test type	Toxicity Endpoint	Standard protocols
<u>Green algae:</u>				
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72–96 h	chronic	growth	ISO 8692, [40]
<u>Waterflea:</u>				
<i>Daphnia magna</i>	48 h	acute	mortality	ISO 6341-L40, US EPA, 2002
	21 days	chronic	fecundity	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	96 h	acute	mortality	ISO 20665, [40]
	7–8 days	chronic	fecundity	
<u>Fish:</u>				
<i>Danio rerio</i>	96 h	acute	mortality	ISO 7346
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28 days	chronic	growth	ISO 10229
<i>Pimephales promelas</i>	96 h	acute	mortality	[40,41]
	7 days	chronic	growth	





VANTAGGI E LIMITI DELL'APPROCCIO ECOTOSSICOLOGICO

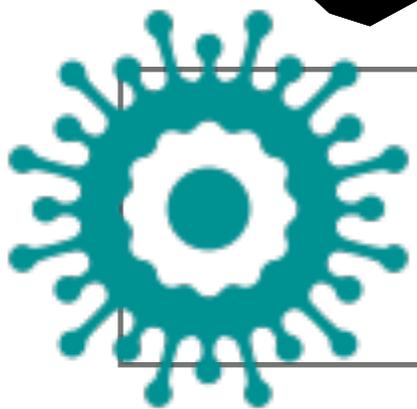
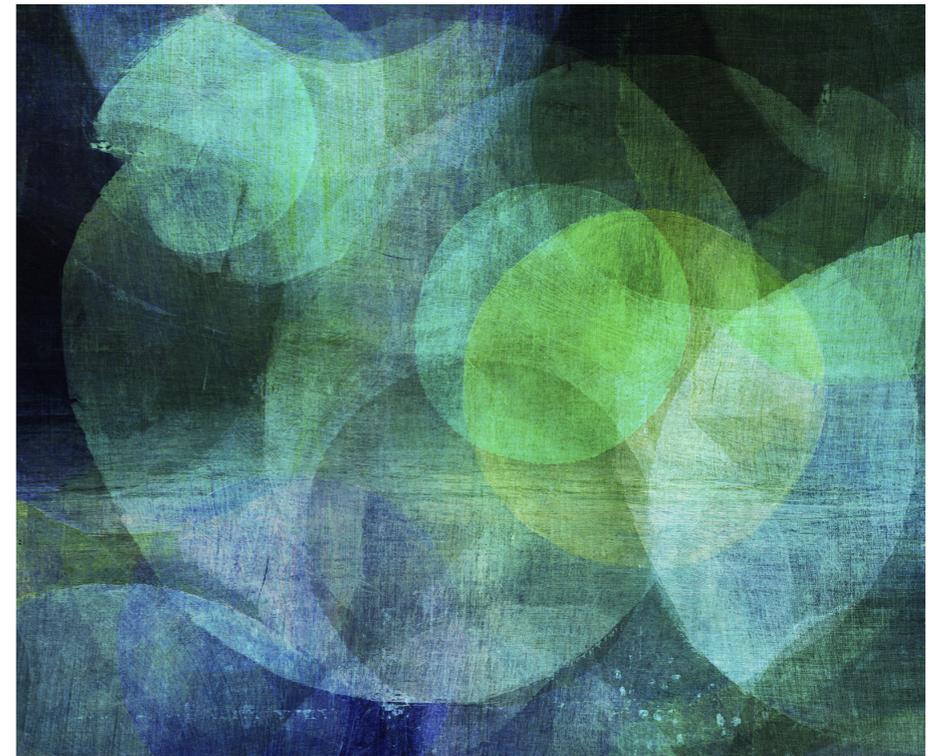
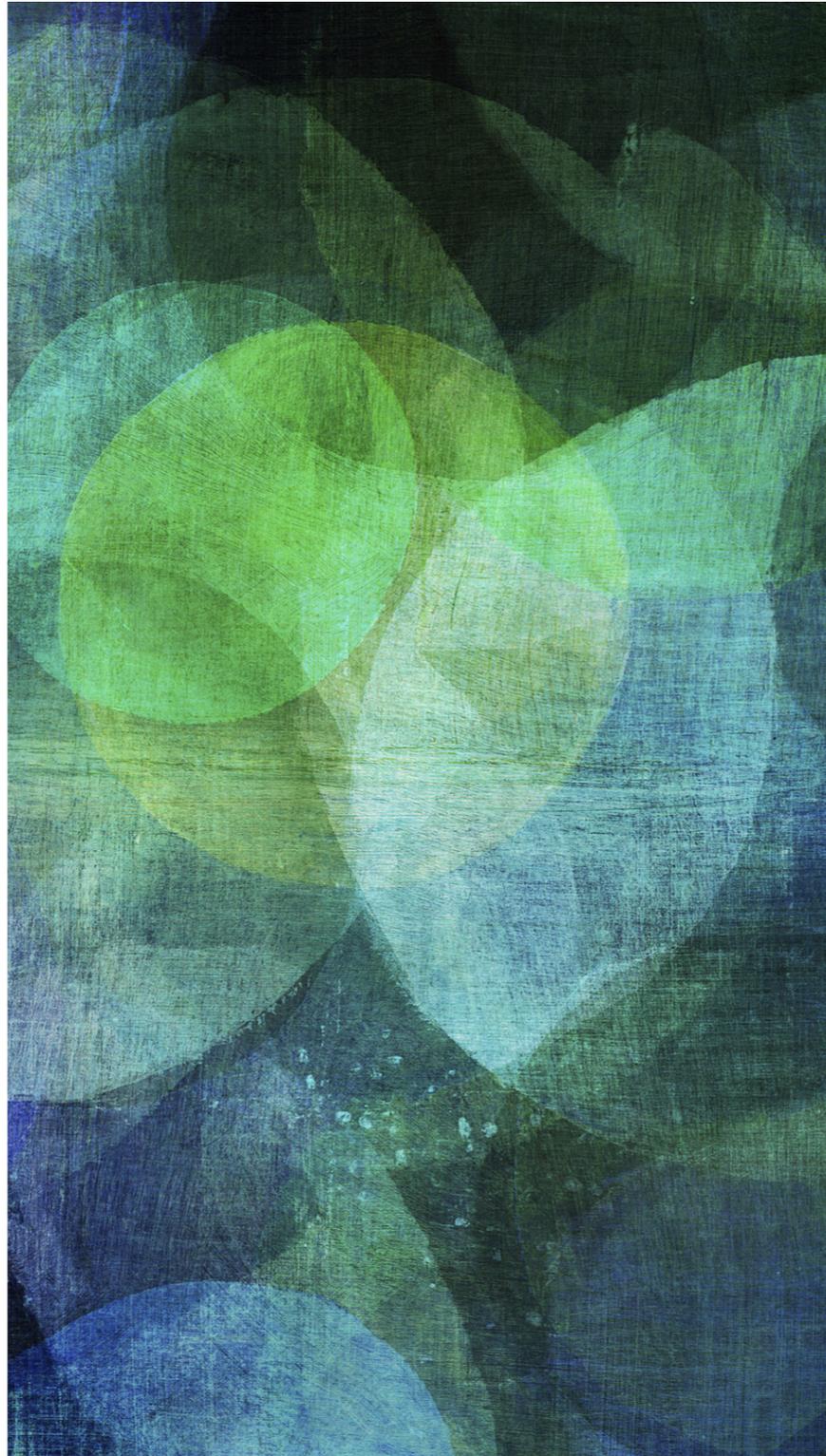


- Permettono valutazioni globali dell'impatto di tutti gli agenti inquinanti sull'ambiente naturale
- Sono condotti in laboratorio in condizioni controllate e standardizzate
- Test pratici e di facile impiego
- Utilizzano specie indicative e sensibili per valutare impatti sull'ambiente
- Breve durata del test
- Chiare relazioni dose-effetto
- Endpoint facili da rilevare
- Specie rappresentative per l'ambiente
- Popolazioni testate con variabilità genetica contenuta
- Metodi standardizzati



- Non permettono di testare tutte le specie ambientali esposte, né tutte le possibili vie di esposizione
- Valutano l'effetto inquinante ma non ne identificano la causa
- Impossibilità di riprodurre in laboratorio la complessità degli ambienti naturali
- Utilizzano un numero limitato di specie
- Scarsa rappresentatività ambientale
- Scarso potere predittivo su casi reali

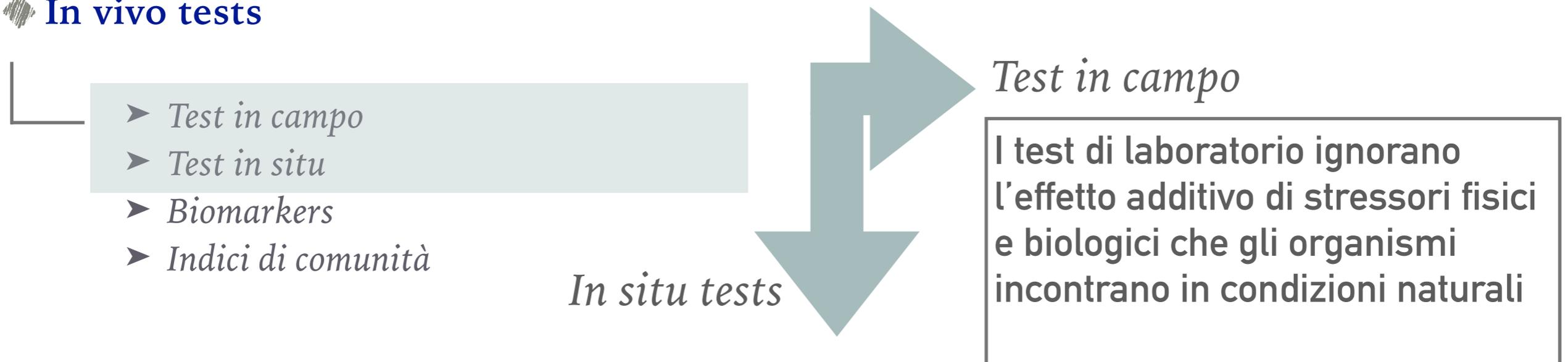
Talvolta può fornire una risposta
"SUPERFICIALE"



DOMANDE??

☑ Biotests: in vivo tests

◆ In vivo tests



- ✦ Step intermedio tra le condizioni di laboratorio e il monitoraggio ambientale
- ✦ è richiesta una accurata pianificazione
- ✦ Le specie testate devono essere rilevanti per il sito di studio e come specie modello oppure essere specie chiave.

I fattori ambientali sito-specifici possono indurre una deviazione importante sui risultati

Metodi non standardizzati (es. sistemi by-pass, gabbie, organismi trapiantati)

Gli organismi test non devono subire stress dalle enclosures

L'esposizione chimica deve essere misurata e determinata per identificare effetti tossici

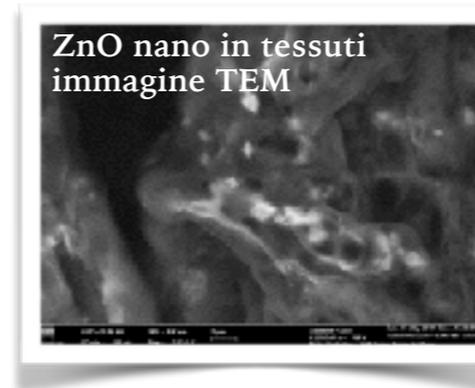
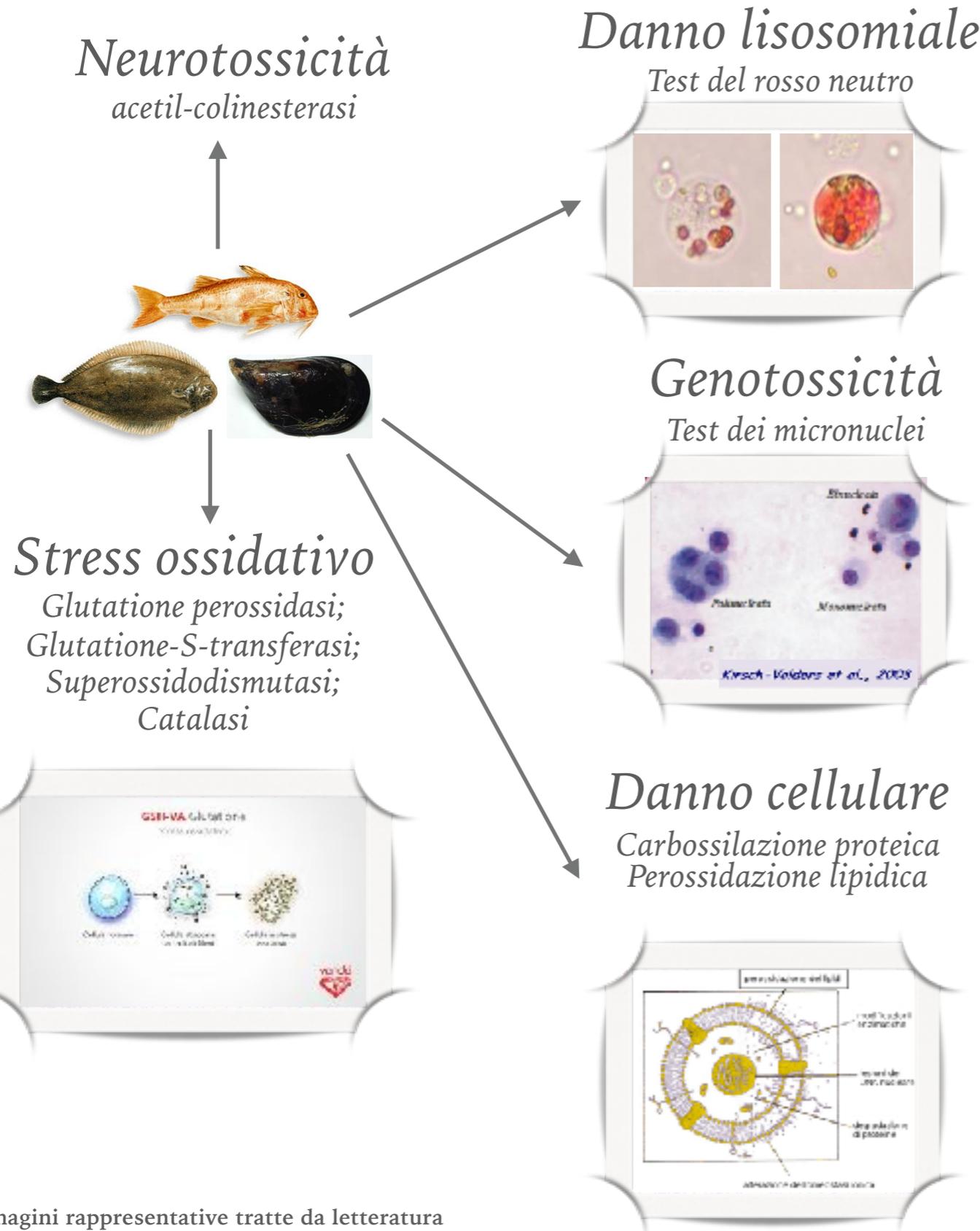
Le condizioni dell'habitat di riferimento/controllo devono essere confrontabili con il sito di studio

BIOMARKERS

Forniscono risposte integrate a dosi subletali in condizioni di stress simulato o in condizioni naturali su tutti gli organismi viventi

Sono definiti come "alterazioni molecolari, biochimiche, cellulari e biologiche causate da uno stressore esterno"

Huggett et al., 1992



Istopatologia

Danno strutturale organi vitali:

- ✘ epato-pancreas
- ✘ apparato branchiale
- ✘ gonadi
- ✘ alterazioni tessuti embrionali

Alterazioni strutturali

- ✘ Anomalie apparato radicale
- ✘ Alterazione allungamento fusto
- ✘ Alterazione tempi di foliazione
- ✘ Aging precoce (riduzione tempo seme)



Stress cloroplasto

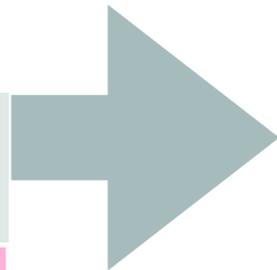
Alterazione del complesso fotosintetico
Danni al cloroplasto



Indicatori di stress precoce e strumenti innovativi

◆ Nuovi strumenti

- ▶ Transcriptomics
- ▶ Proteomics
- ▶ Metabolomics
- ▶ Epigenetics
- ▶ Genotyping



◆ Analisi globale dell'espressione genica (mRNA)



Inefficienze, tassi di degradazione, inefficienze translazionali

◆ Valutazione ad alto rendimento delle risposte funzionali dell'espressione genica (proteine)



- ◆ **Metabolomica** - Concentrazione del metabolita che rappresenta l'attività enzimatica sugli xenobiotici (processi di degradazione), fortemente associata a tecniche bioinformatiche
- ◆ **Epigenetica** - Cambiamenti nella funzione genica o nel fenotipo cellulare senza cambiamenti nelle sequenze di DNA (es. Qualsiasi metilazione o modifica dell'istone)
- ◆ **Genotipizzazione** - Evidenziare cosa significa sensibilità da un organismo all'altro. Parametro importante per la resilienza dell'ecosistema che evidenzia la sensibilità intra-specie

INDICI DI COMUNITA'

Le comunità di organismi si trovano a un livello di organizzazione biologica che rappresenta l'integrità dell'ecosistema poiché derivano dagli effetti combinati di fattori di stress fisici, chimici e biologici che agiscono

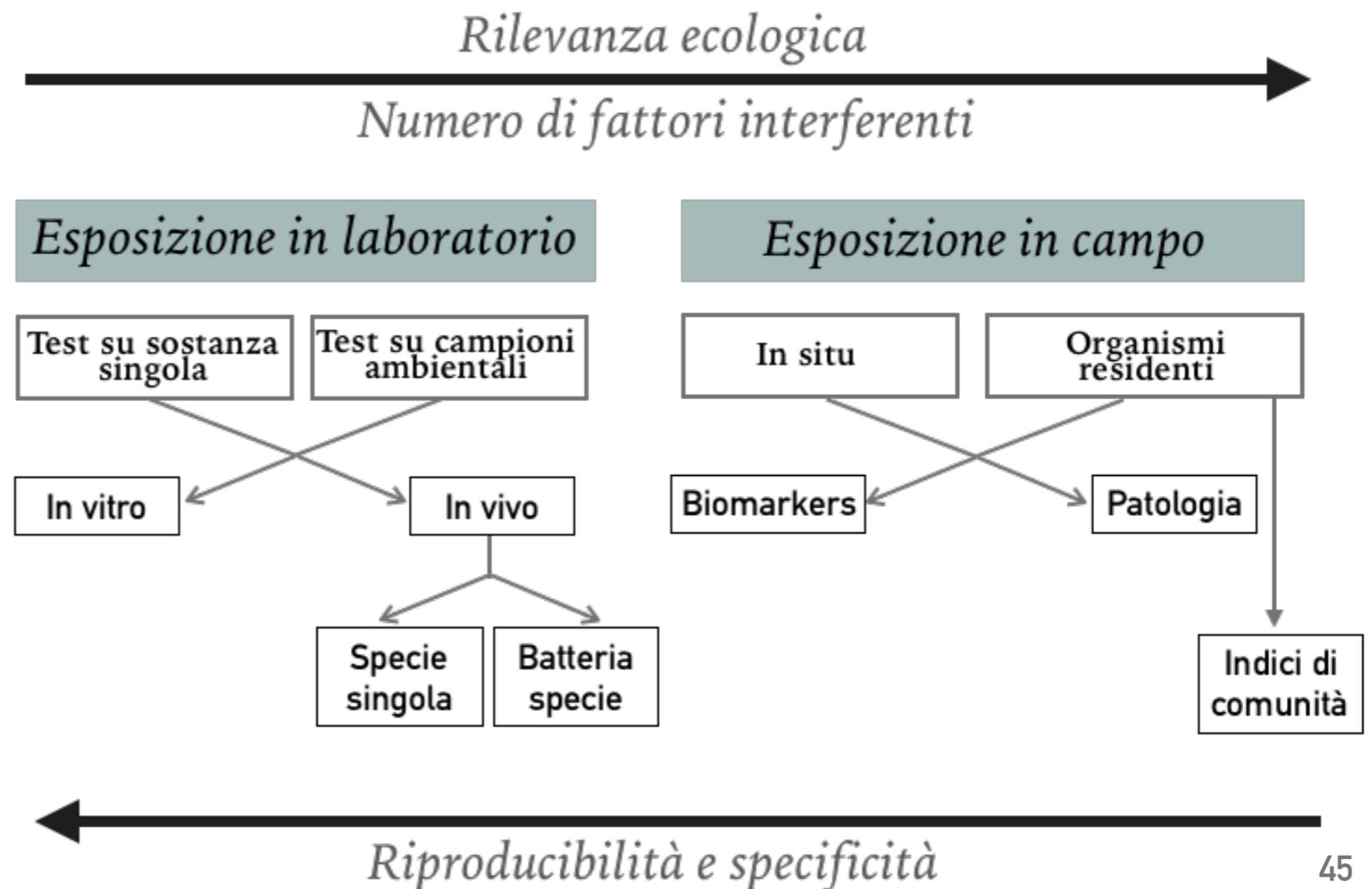
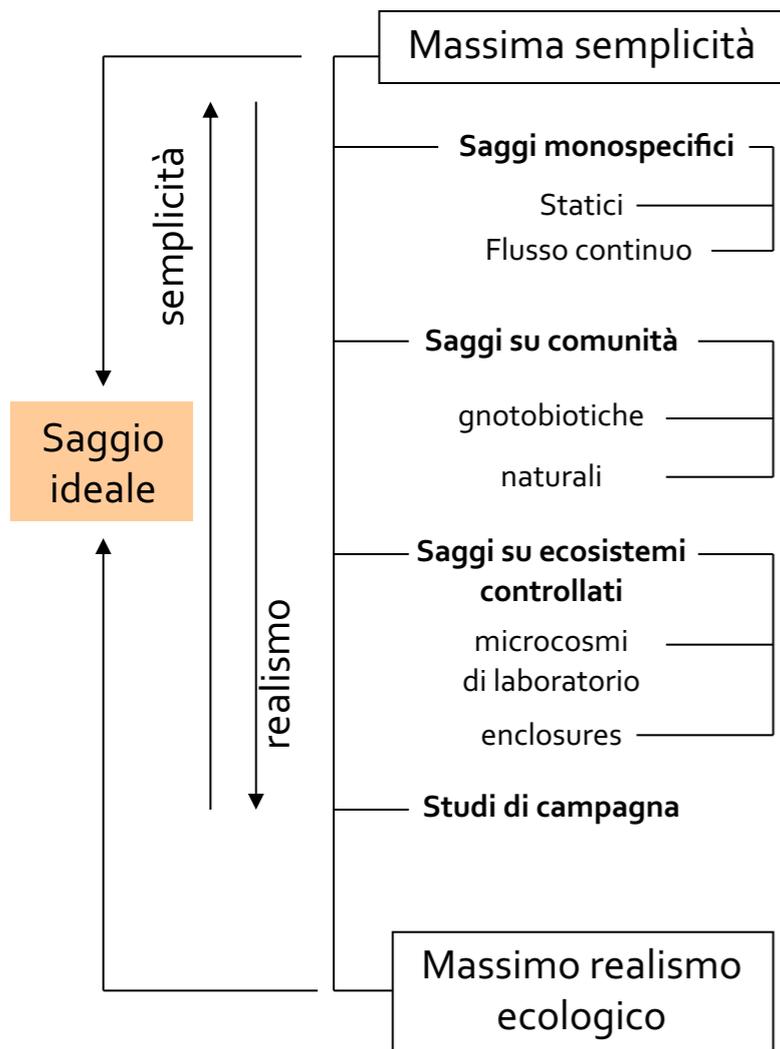
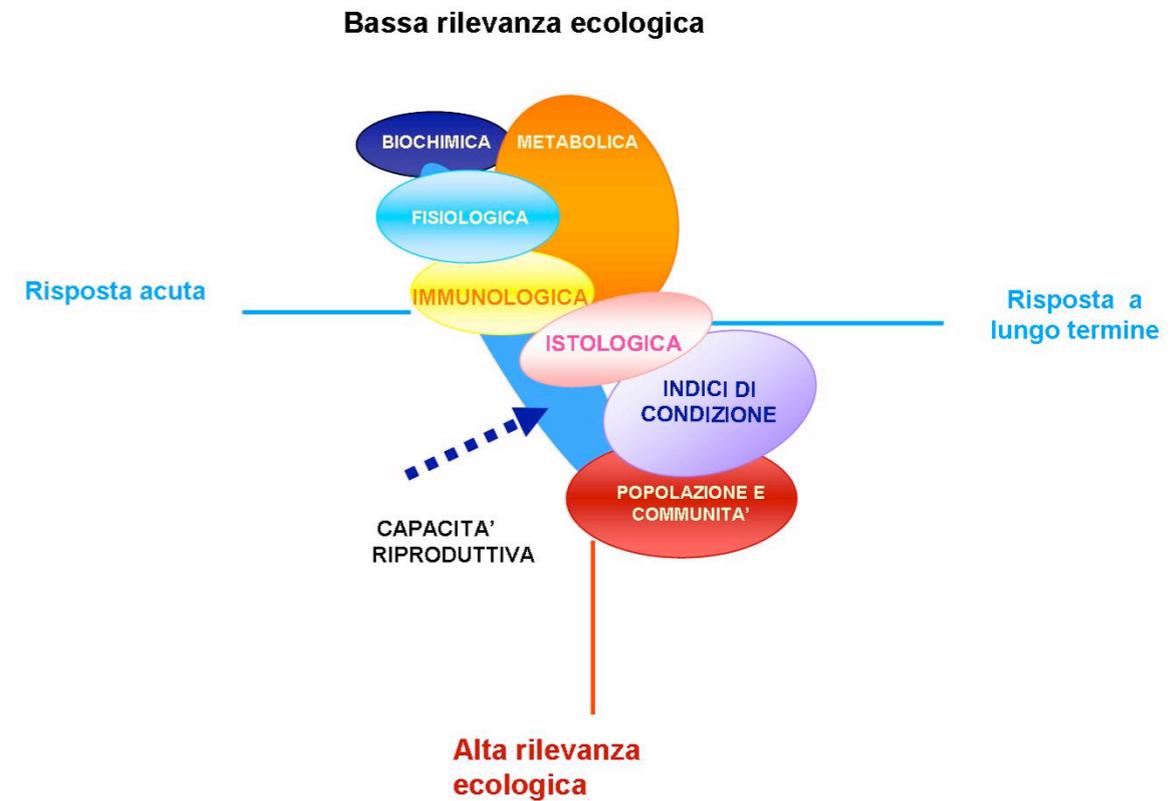
Cambiamenti nella struttura
(numero, abbondanza e
diversità delle specie)

Cambiamenti nella funzione
(sostituire specie sensibili
con resistenti)

- **Indice di integrità biologica (IBI)**
- **SPEcies At Risk (SPEAR)**
- **Tolleranza della comunità indotta dall'inquinamento (PICT)**

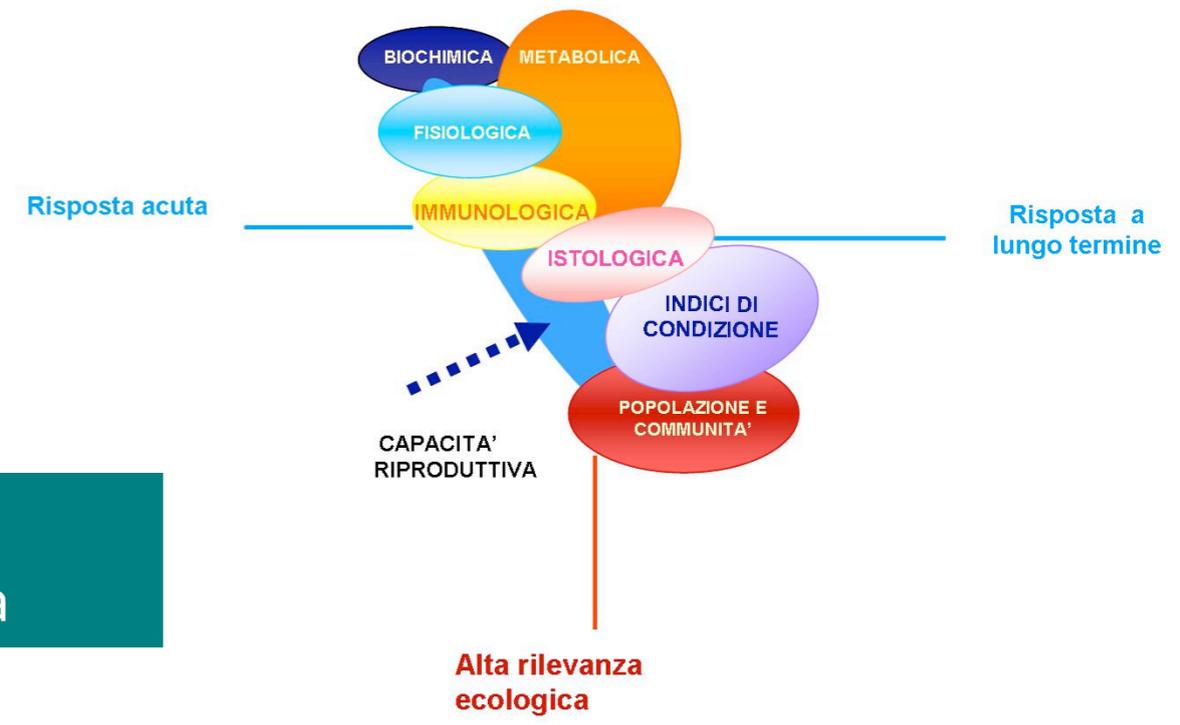
DM 173/2016 - Dragaggio di sedimenti
Diversità macrozoobentica nei fondi molli

Scale dimensionali e temporali delle risposte



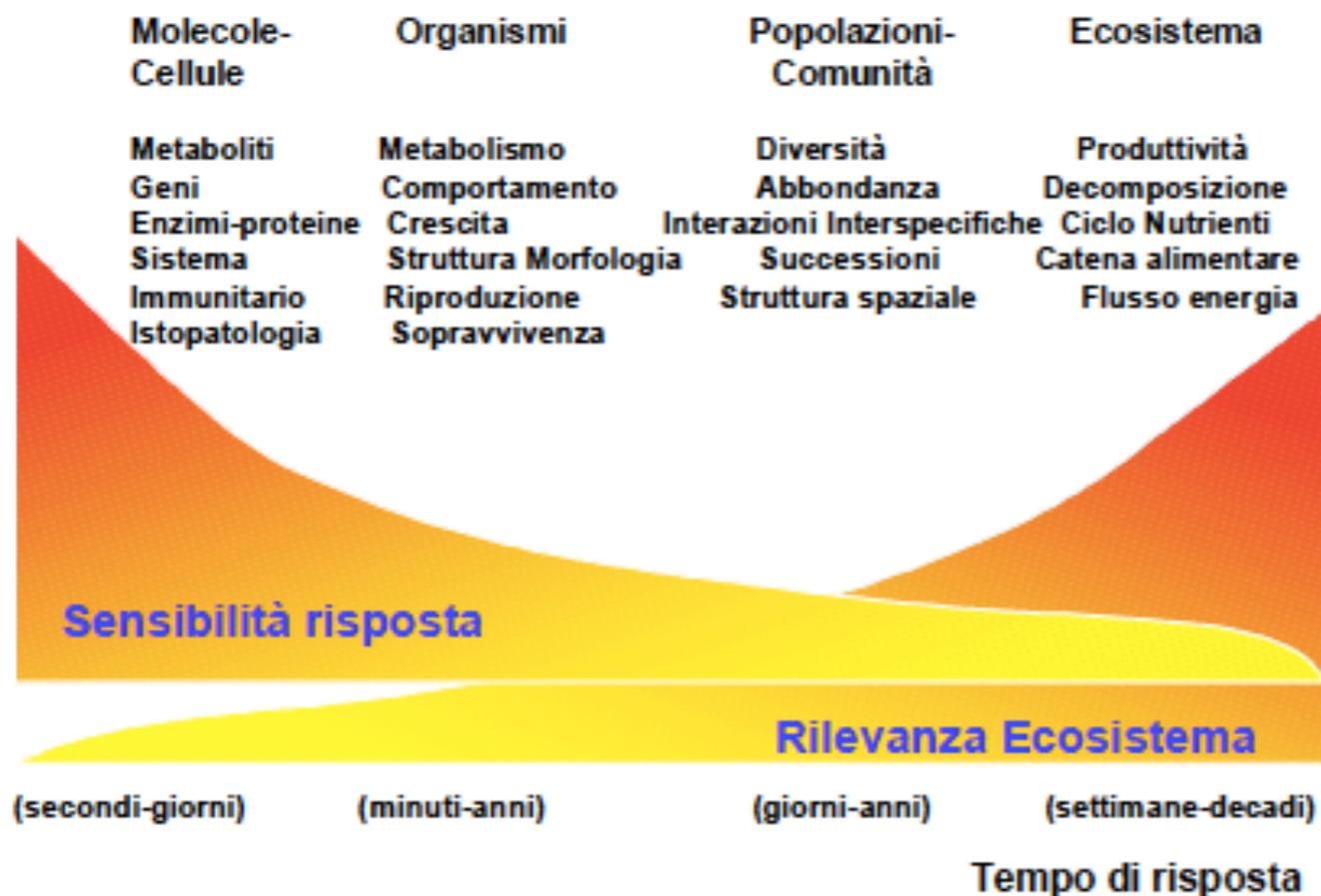
◆ Livelli di organizzazione gerarchica e effetti

Bassa rilevanza ecologica



La quadratura del cerchio: ottimizzare rilevanza, sensibilità e tempi di risposta

Livelli di organizzazione biologica



Mirare a diversi livelli di organizzazione biologica dalle molecole alle comunità

Sensibilità e rilevanza dei test ai diversi livelli di organizzazione (Burton, 1991).



QUADRO NORMATIVO: LEGGI INERENTI L'ECOTOSSICOLOGIA

Una concreta opportunità per servizi di consulenza ed analisi su scala locale



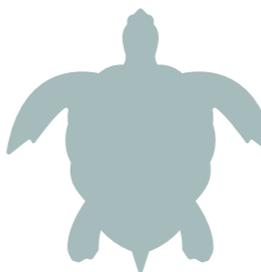
Leggi nazionali ed internazionali

- 📌 Decreto Ministeriale n. 173; 15 Luglio 2016
- 📌 Decreto Ministeriale n. 172; 15 Luglio 2016 (SIN)
- 📌 Regolamento CE 440; 2008 (REACH)
- 📌 Decreto Legislativo n. 152; 2006 (Standard ambientali)
- 📌 Classificazione dei rifiuti (HP14)
- 📌 Regolamento a tutela delle acque superficiali (testo unico ambiente)

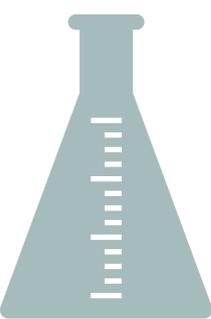

Tutela delle acque


*Dragaggi fondali
marini e sistemi
portuali*

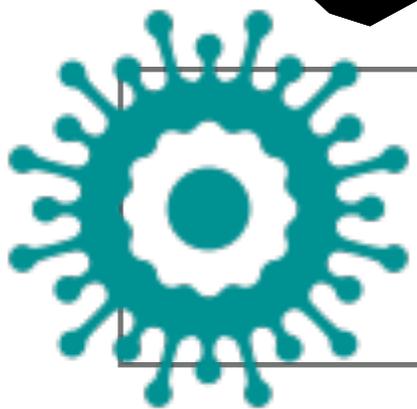
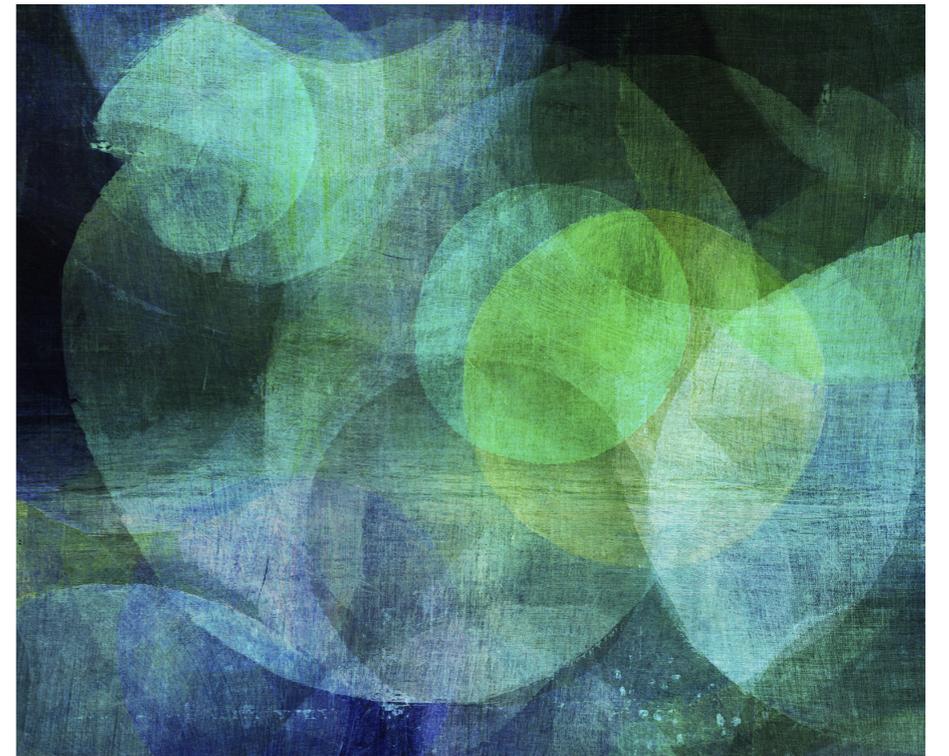
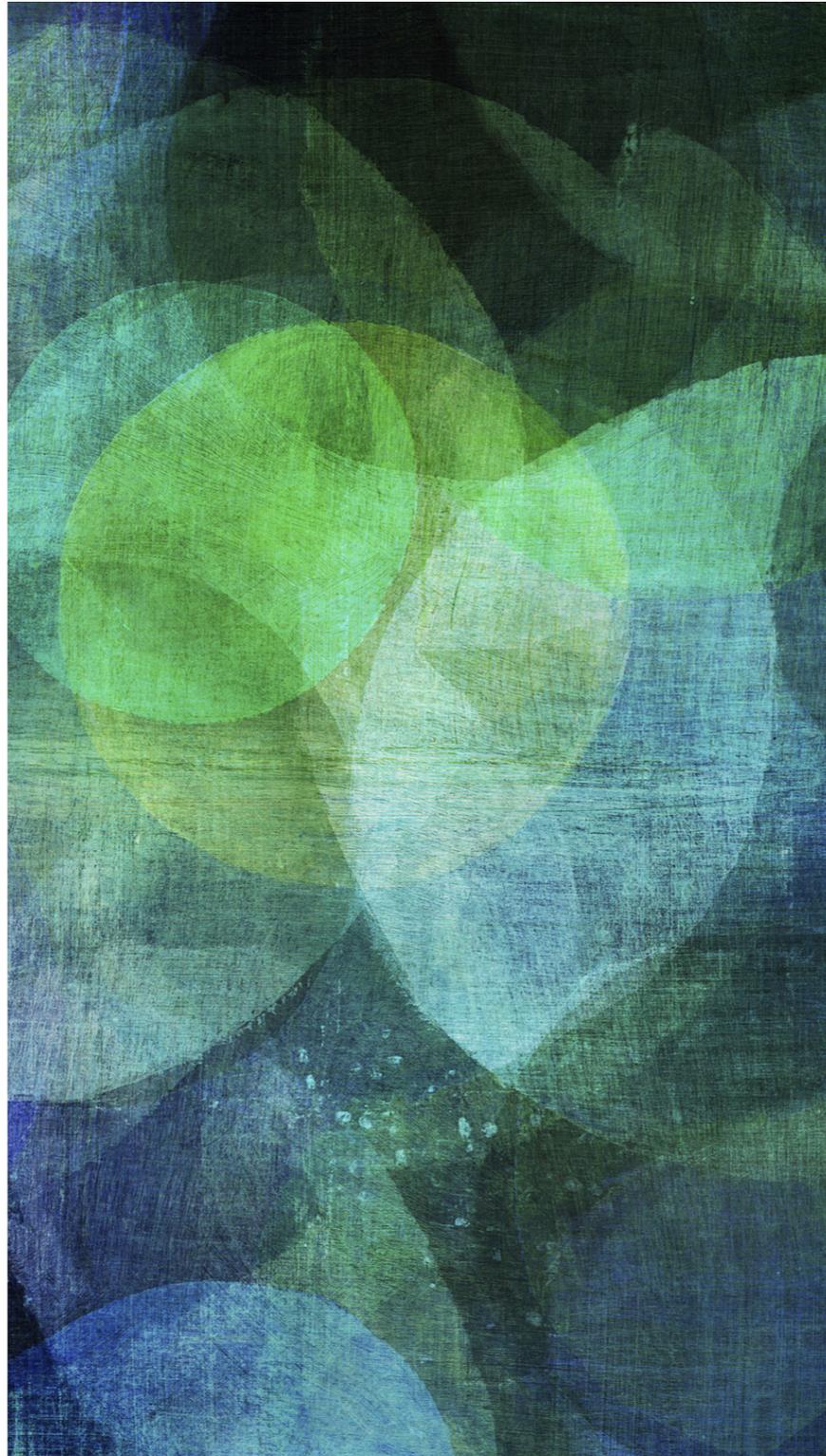

SIN


AMP


Emissioni in ambiente


*Sostanze chimiche e
miscele commerciali*


Rifiuti



DOMANDE??