



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata XX ciclo**

**Curriculum in ECOLOGIA**

***Valutazione della contaminazione di suoli a diverso  
impatto antropico mediante saggi ecotossicologici***

Coordinatore:  
Prof.ssa Amalia Virzo De Santo

Candidato:  
Dott.ssa Sonia Manzo

Tutore:  
Dott.ssa Giulia Maisto

A.A. 2006-2007

*Alla mia famiglia*

*Volli,  
sempre volli,  
fortissimamente volli.*

*V. Alfieri*

# **Indice**

## **Introduzione**

1. Inquinamento dei suoli
  - Metalli pesanti
  - Idrocarburi policiclici aromatici
2. L' ecotossicologia dei suoli
  - L' ecotossicologia
  - Test ecotossicologici
3. La valutazione della tossicità
4. Scopo della ricerca

## **Materiali e Metodi**

1. Campionamento dei suoli
2. Caratterizzazione dei suoli
3. Test ecotossicologici
  - Matrici
  - Test ecotossicologici con gli estratti acquoso ed organico
  - Test ecotossicologici con il suolo tal quale
  - Espressione dei risultati
4. Analisi statistica
5. Indice di rischio ecotossicologico

## **Risultati**

- Caratterizzazione chimica e fisica
- Test ecotossicologici
- Comparazione diverse matrici
- Sensibilità dei test ecotossicologici
- Relazione tra tossicità e concentrazione totale di IPA
- Correlazione tra IPA e tossicità
- Calcolo TBI ed applicazione classi di rischio

## **Discussione**

## **Conclusioni**

## **Bibliografia**

# Introduzione

## 1. L'inquinamento dei suoli

Il suolo deriva dall'alterazione chimico-fisica delle rocce ad opera degli agenti atmosferici che portano alla formazione del "regolite" e dalla decomposizione della necromassa da parte dei microrganismi. L'alterazione biologica può essere sia di tipo attivo (alterazione chimica e meccanica dovuta agli organismi viventi), che di tipo passivo (apporto di sostanza organica dai resti vegetali e animali in decomposizione).

La frazione inorganica del suolo è formata in parte dai minerali ereditati dalla roccia (Fe, Mn, Mg, Ca,  $\text{AlO}_3$ ,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{SiO}_4$  ecc.) in parte da minerali di neoformazione come l'ematite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) che si forma in condizioni di xericità e conferisce il caratteristico colore rosso a molti suoli mediterranei (Boero, 1989).

Nel corso della decomposizione dei residui vegetali si formano, sostanze minerali ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ , solfati, nitrati, ecc.) e composti colloidali ad alto peso molecolare, definiti nel loro insieme "humus". Esso è costituito da "acidi fulvici" (componenti organici poco solubili e poco polimerizzati) "acidi umici" (composti organici a solubilità variabile ma più polimerizzati) e da altri materiali organici, principalmente "umina". Esso costituisce in media il 2-4% in peso della massa totale del suolo, e riesce a contenere grandi quantità di acqua (fino a 20 volte il suo peso) costituendo, insieme alle argille, la principale fonte di elementi nutritivi per le piante (Bullini, 1998).

Tali processi vengono operati dai microrganismi (funghi, batteri, attinomiceti), favoriti dai microartropodi e lombrichi, che, operano

uno sminuzzamento e una redistribuzione dei detriti organici nel suolo, aumentando la superficie e quindi la biodisponibilità.

Il suolo può essere suddiviso in 5 frazioni granulometriche (Tab. 1.1).

**Tabella 1.1.** Frazioni granulometriche dei suoli secondo il criterio USDA

Frazione	Diametro [mm]
Scheletro	$D > 2$
Sabbia grossa	$0,2 < D < 2$
Sabbia fine	$0,02 < D < 0,2$
Limo	$0,002 < D < 0,02$
Argilla	$D < 0,002$

Il pH del suolo diventa acido per effetto della lisciviazione operata dall'acqua meteorica, che allontana le basi più solubili, le quali vengono sostituite dai carbonati, sempre presenti poiché il processo di umificazione libera grandi quantità di  $\text{CO}_2$ . I suoli basici si formano per la presenza di  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e sono ben tollerati dalla vegetazione e dalla flora microbica.

L'inquinamento può essere definito come "l'immissione o il prelievo nell'ambiente di materia e/o di energia tali da provocare un'alterazione persistente e talvolta irreversibile" (Della Croce *et al.*, 1997). Tale alterazione può essere di tipo chimico, come ad esempio concentrazioni anomale di un elemento, o di tipo fisico, come anomalie del campo elettromagnetico o della radiazione luminosa.

L'inquinamento dei suoli può causare una serie di alterazioni che possono ripercuotersi non solo sulla composizione chimica ma anche sull'attitudine ad ospitare piante ed altri organismi viventi. Gli inquinanti dei suoli, a causa della loro ampia diffusione e pericolosità, sono oggetto di studio nella valutazione del rischio. Il loro

comportamento è regolato da diverse variabili legate alle caratteristiche del suolo e a quelle dell'inquinante.

I parametri da considerare sono:

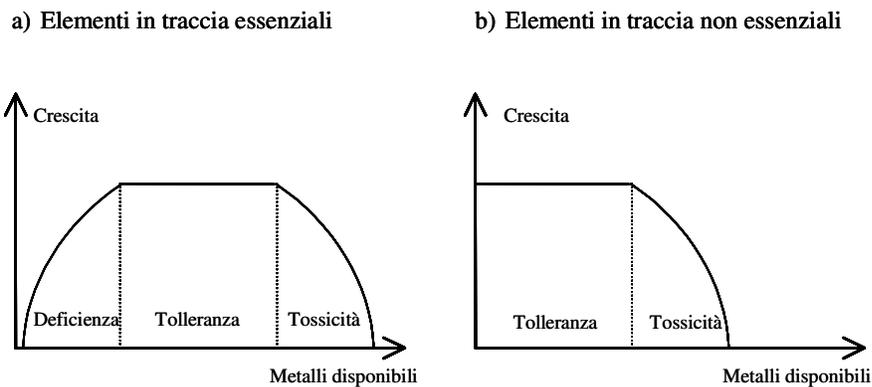
- La speciazione dell'inquinante. L'inquinamento infatti non dipende solo dal contenuto totale di un elemento ma dalle forme chimiche in cui è presente (es. valenza dei metalli pesanti);
- La biodisponibilità. Solo una parte della quantità di un composto presente nel suolo è interessata dai processi nutrizionali degli organismi (funghi, lieviti, batteri, piante etc.). Essa dipende sia dalla natura chimica della sostanza che dalla specie biologica interessata;
- La degradabilità. Valutabile come velocità di trasformazione, essa è legata al periodo di persistenza del prodotto nel suolo e dalla volatilità, solubilità e adsorbimento dai costituenti del terreno;
- La valutazione della capacità tampone del suolo. La capacità del suolo di contrapporsi agli effetti indotti dall'esterno è strettamente legata alle caratteristiche chimiche e fisiche del suolo stesso.

Tra i principali contaminanti chimici dei suoli vi sono i metalli pesanti e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

### *Metalli pesanti*

In termini strettamente chimici, i metalli pesanti sono quegli elementi con proprietà metalliche e che si comportano come cationi quando entrano in un campo elettromagnetico. Tendono a formare legami complessi con le macromolecole biologiche (lipidi, proteine ecc.) alterando la loro struttura nativa e quindi la loro funzione.

I metalli pesanti, con eccezione di Fe e Al, appartengono ai cosiddetti “elementi in traccia”, presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori allo 0,1%. La loro concentrazione nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce, è solitamente di parti per milione o per miliardo. Da un punto di vista biologico con il termine elemento in traccia ci si riferisce ad un elemento inorganico, essenziale o non per il metabolismo, normalmente presente in tracce negli organismi ma con un potenziale effetto tossico dipendente dalla concentrazione (Fig. 1.1)



**Figura.1.1.** Curve dose risposta per gli elementi in traccia nelle piante. (Baker *et. al.*, 1989).

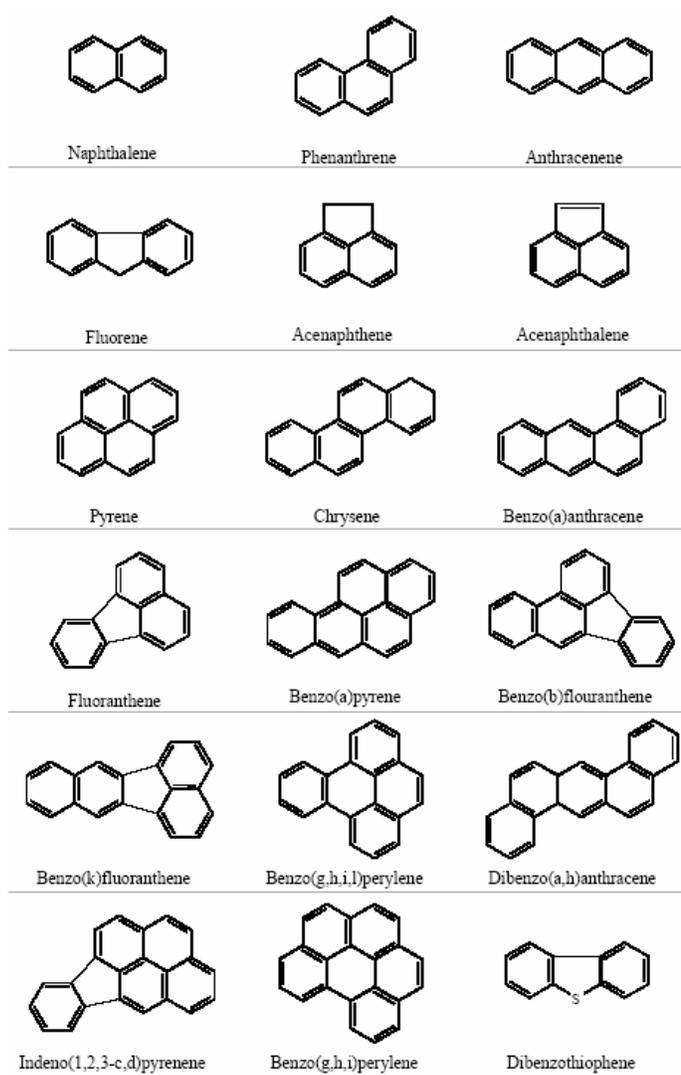
La biodisponibilità dei metalli nel suolo può essere influenzata da molti fattori come il pH, l'Eh, il contenuto di argilla, il contenuto di sostanza organica, la capacità di scambio ionico, l'equilibrio di nutrienti, le concentrazioni di altri elementi in traccia, la temperatura e l'umidità del suolo. Anche l'attività metabolica di molti microrganismi può intervenire sulla disponibilità dei metalli pesanti attraverso l'alterazione del loro stato di ossidazione (anche con l'aggiunta di gruppi metile) ed il sequestro nel citoplasma mediante le proteine chelanti.

La tossicità dei metalli pesanti è dovuta anche alla loro liposolubilità. Essi tendono infatti a concentrarsi nei tessuti adiposi ed essendo escreti molto lentamente causano il fenomeno della “magnificazione biologica”, ovvero la tendenza a concentrarsi negli organismi da un livello trofico all’altro lungo la catena alimentare.

*Idrocarburi policiclici aromatici*

Il petrolio è massicciamente utilizzato per coprire l’enorme domanda energetica dei paesi industrializzati e per produrre innumerevoli materie sintetiche di origine organica come i solventi e le plastiche. Considerando le perdite dai serbatoi, dagli oleodotti, dalle petroliere, dalle raffinerie dai pozzi e dai terminali di distribuzione, i composti organici sono diventati una forte minaccia sia per gli ecosistemi acquatici che per quelli terrestri.

Una tra le categorie più pericolose per la loro diffusione e per la loro tossicità è quella degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA).



**Figura 1.2.** Struttura degli IPA più comuni.

Gli IPA sono derivati del benzene e sono costituiti da 2 o più anelli aromatici (Fig. 1.2). Sono contaminanti pressoché ubiquitari e derivano dalla combustione incompleta di materiali organici complessi (Ahn *et al.*, 1999; Johnsen *et al.*, 2005). Le principali fonti di emissione sono di tipo antropico e naturale: processi di ossidazione dei combustibili fossili o incendi boschivi. Gli IPA prodotti durante gli incendi boschivi non rappresentano una minaccia per la salute

dell'ambiente, data la loro diffusione nel tempo e nello spazio, invece quelli generati dalle attività antropiche costituiscono un grave pericolo per la salute dell'uomo poiché tendono a concentrarsi in zone di estensione limitata (Gabos *et al.*, 2001; NCP, 1997).

La solubilità nell'acqua è molto scarsa e tende a diminuire con l'aumentare degli anelli aromatici, per esempio l'antracene, un IPA a 3 anelli ha una solubilità di 0,37  $\mu\text{mol/L}$ . (Ahn *et al.*, 1999). Il pH basico incrementa la loro solubilità. Invece, l'aumento della temperatura provoca solo la volatilizzazione dei composti più leggeri. La solubilità nei solventi apolari è altissima, ad esempio, la costante di ripartizione  $\log_{10}(K_{ow})$  dell'antracene in ottanolo/acqua è di 4,45 (quindi 10.000 volte più solubile in ottanolo).

La solubilità degli IPA nell'ambiente naturale è praticamente impossibile da misurare per diverse ragioni, innanzitutto non si trovano mai allo stato puro, inoltre numerose impurità e solventi organici ne possono incrementare la solubilità, infine quelli a basso peso molecolare come il naftalene sono volatili mentre gli altri hanno un'ottima affinità per le argille ed i composti umici e pertanto sono adsorbiti. La frazione adsorbita dalle micelle è biodisponibile e può essere utilizzata per il metabolismo cellulare dai batteri del suolo. Le micelle infatti si comportano come surfattanti naturali, essendo anfipatiche, rendendo solubili gli IPA anche nel mezzo acquoso (Garon *et al.*, 2002). Tuttavia, vi sono degli studi che dimostrano che il carbonio organico del suolo si combina tenacemente agli IPA rendendoli indisponibili per i microrganismi e mitigandone quindi la tossicità (Weissenfels *et al.*, 1992).

Gli IPA, vista la loro grande affinità per il particolato, possono viaggiare per migliaia di km trasportati dal vento, fino ad accumularsi ad esempio nei sedimenti marini da dove sono poi rimossi lentamente

per effetto della volatilizzazione e del consumo da parte della microflora marina (Gorden *et al.*, 1993; Juhasz, 1997; Johnsen *et al.*, 2005).

Alcuni di essi sono cancerogeni per i mammiferi, compreso l'uomo (IARC, 1983). L'esposizione prolungata agli IPA in ambiente industriale sembrerebbe causare un aumento dell'incidenza di tumore ai polmoni (Bjorseth *et al.*, 1986). La cancerogenità degli IPA sembrerebbe determinata da alcune reazioni metaboliche che avvengono nell'organismo al fine di renderli idrosolubili e quindi eliminabili. Le reazioni di epossidazione ed idrossilazione oltre ad incrementare la solubilità degli IPA, ne aumentano anche l'affinità per il dsDNA (intercalandosi nella doppia elica) inducendo mutazioni durante la replicazione (Bjorseth *et al.*, 1986). I composti con 2 e 3 anelli come naftalene, fenantrene e antracene tendono a provocare un effetto tossico acuto a differenza di quelli con 4 e 5 anelli che possono generare effetti cronici trasmissibili alla progenie (Guilherme, *et al.*, 1998).

## 2. L'ecotossicologia dei suoli

### *L'ecotossicologia*

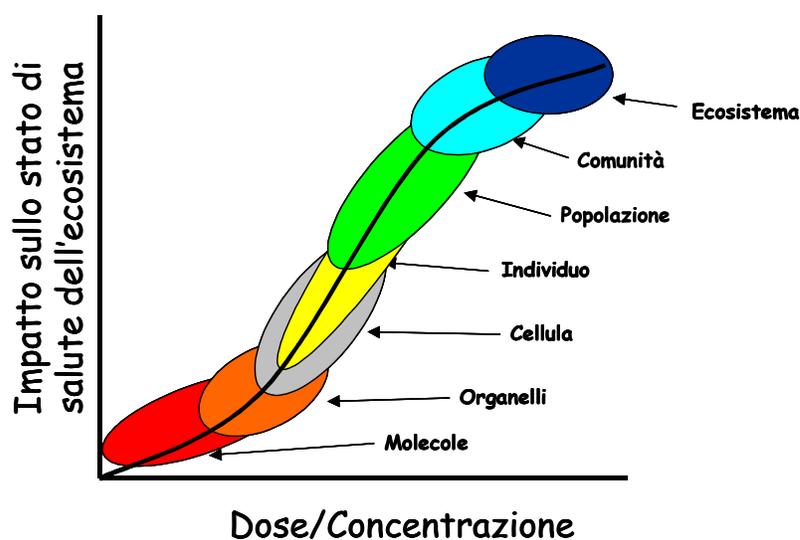
“L'ecotossicologia” è la scienza che, utilizzando metodi e concetti propri della tossicologia, applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi (APAT, 2004). Inizialmente l'utilizzo di “test biologici” era rivolto unicamente alla definizione di quanto già accaduto; attualmente, la prospettiva nella quale si inseriscono i test biologici include l'approccio predittivo, utilizzando le analisi come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale.

La caratterizzazione chimica del suolo non consente, da sola, di esprimere valutazioni relative al pericolo per gli organismi viventi né di determinare la tossicità della matrice. A tal proposito, si può ricorrere agli strumenti ecotossicologici che forniscono informazioni importanti sulla biodisponibilità ed eventuali azioni sinergiche degli inquinanti verso i sistemi biologici. L'effetto biologico è legato alla frazione biodisponibile delle sostanze contaminanti che, a sua volta, dipende dalle sostanze chimiche presenti e dalle condizioni ambientali. Risulta pertanto necessario utilizzare il “monitoraggio biologico” per una corretta valutazione del pericolo derivante dalla contaminazione del suolo.

I saggi ecotossicologici sono quindi impiegati sia nella valutazione della qualità dei suoli sottoposti a rischi di contaminazione, sia nel valutare l'efficacia della bonifica biologica del suolo nel tempo (biomonitoraggio).

### Test ecotossicologici

Un “test ecotossicologico” è un saggio di durata variabile e con un protocollo definito in cui si misura l’effetto di sostanze su molecole, cellule, organismi, popolazioni e comunità (Fig. 2.1). Gli organismi possono essere utilizzati in laboratorio nelle prove di tossicità oppure osservati nel loro ambiente naturale e rappresentare gli indicatori delle condizioni ambientali.



**Figura.2.1.** Livelli di azione dei contaminanti.

In genere il test prevede l’esposizione di un organismo vivente per un certo periodo alla sostanza in esame e la valutazione della risposta mostrata dall’organismo (Maffiotti *et al.*, 1997). Un contaminante può interagire con diverse strutture di un organismo con funzioni biologiche specifiche (immissione, accumulo, azione, metabolismo ed escrezione). L’immissione corrisponde ai modi d’ingresso dell’inquinante nell’organismo (contatto, ingestione). Nei siti di accumulo, gli xenobiotici sono inerti dal punto di vista tossicologico, almeno finché il sito (in genere si tratta di depositi di grasso, micelle

lipoproteiche, o membrane cellulari) non viene metabolizzato (ad es. in seguito a malattia, denutrizione o migrazione, ma anche nel periodo riproduttivo). Nei siti di azione, la sostanza interagisce con una macromolecola endogena (ad es., una proteina o il DNA) o con una struttura (ad es. la membrana cellulare) e tale interazione causa il manifestarsi dell'effetto tossico in tutto l'organismo. I siti del metabolismo sono essenzialmente gli enzimi che metabolizzano gli xenobiotici. Questo processo avviene solitamente in due fasi, una prima biotrasformazione, tramite ossidazione, idrolisi, idratazione o riduzione, che determina in genere la produzione di metaboliti idrossilati, ed una seconda fase in cui il metabolita è soggetto a reazioni di coniugazione fino a trasformarsi in un "coniugato". La maggior parte delle volte il metabolismo determina una detossificazione, ma in alcuni casi alcune reazioni possono incrementare l'effetto tossico di queste sostanze. I siti di "escrezione" eliminano il composto originale o un prodotto della sua biotrasformazione (un metabolita o un coniugato).

Alcuni inquinanti possono essere assimilati dagli organismi in misura maggiore di altri. Ciò può essere misurato tramite il fattore di bioconcentrazione. Per esempio, ciò accade con le sostanze inorganiche la cui entità di bioaccumulo a lungo termine dipende esclusivamente dal tasso di escrezione. Gli animali con uno scheletro, un esoscheletro o un guscio calcareo accumulano Pb e Sr in maggiori quantità di organismi senza tali strutture, perché le sostanze citate seguono i percorsi metabolici del calcio che, hanno un'elevata efficacia di assimilazione (ANPA, 2000)

L'approccio ecotossicologico è anche utilizzato per la determinazione e la valutazione degli effetti tossici acuti e cronici esercitati da matrici ambientali contaminate, su organismi o gruppi di organismi ad esse

esposte. L'effetto tossico acuto si evidenzia in un lasso di tempo breve e, comunque, inferiore al tempo di generazione dell'organismo in esame, e prevede la valutazione di "endpoints" facilmente evidenziabili quali, ad esempio, l'immobilizzazione o la morte degli organismi impiegati nei saggi. L'effetto tossico "cronico" si sviluppa, viceversa, in un periodo di tempo più lungo, può coinvolgere più generazioni di individui esposti e produce risposte che non compromettono la sopravvivenza degli organismi.

La tossicità viene, di solito, ricercata su matrici liquide che possono essere costituite da campioni di acque di scarico, acque superficiali, acque di falda, elutriati di matrici solide. Le determinazioni della tossicità dei suoli possono essere condotte sia direttamente sulla matrice solida, che sull'elutriato e sull'estratto organico. Le prove di tossicità condotte direttamente sulla matrice solida risentono, a differenza delle normali prove di tossicità acquatica, delle interazioni tra il suolo e la componente tossica, interazioni che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle sostanze tossiche. D'altronde, le prove sulla matrice solida hanno il vantaggio di utilizzare la matrice *in toto* e non solo l'estratto acquoso, avvicinandosi in tal modo maggiormente alla situazione reale. Le prove di tossicità vengono effettuate sulla fase acquosa per valutare la tossicità dovuta alla presenza e alla biodisponibilità di contaminanti inorganici e microinquinanti idrosolubili. Inoltre, la matrice acqua rappresenta un sistema di trasporto delle sostanze tossiche presenti nel suolo verso gli altri comparti ambientali. Le prove di tossicità condotte con l'estratto organico sono finalizzate all'analisi e al destino ambientale dei microinquinanti organici (Mac Kay, 1991; Calamari, 1993). Nei suoli si evidenzia l'esistenza di un gran numero di composti liposolubili dotati di un elevato coefficiente di ripartizione

ottanolo/acqua, in questi casi, per testarne la tossicità, si utilizzano solventi in grado di portarli in soluzione (ad es. il dimetilsolfossido o il metanolo).

L'utilizzo di organismi viventi in prove di tossicità è codificato in precise metodologie e protocolli applicativi che si rinvengono in moltissime normative tecniche nazionali ed internazionali (EPA, 1985; ASTM, 1994; ISO, 1998; APAT, 2004).

Un test ecotossicologico può essere considerato un buon metodo per la valutazione della tossicità se: 1) l'organismo test mostra sensibilità ad un ampio spettro di contaminanti; 2) esiste una vasta bibliografia sulla biologia e sull'ecologia della specie utilizzata e sulla sua tolleranza alle caratteristiche chimiche e fisiche della matrice; 3) esiste una certa omogeneità della popolazione test (genetica, fisiologica, età, sesso); 4) il saggio è di rapida e semplice esecuzione; 5) il test è standardizzato e riproducibile; ha la capacità di discriminare diversi livelli di tossicità; 7) risulta economico (Perin, 2004).

I test ecotossicologici presentano tuttavia dei limiti tra i quali la rilevanza ecologica. Infatti essi possono non simulare perfettamente le condizioni di campo essendo svolti in laboratorio, ed inoltre non riescono ad evidenziare la contaminazione gassosa (ad es. da H<sub>2</sub>S) di suoli o acque profonde. A tale scopo sono oggi sempre più diffuse tecniche che prevedono lo studio delle comunità biologiche *in situ* come ad esempio il metodo "Qualità Biologica del Suolo" Questo test si basa sull'analisi dell'adattamento al suolo dei microartropodi (< 1mm) presenti in una zolla di terreno di circa 1 kg. Il principio è che la presenza di organismi molto adattati alla vita del suolo sia possibile solo in suoli maturi e poco disturbati. La comunità di microartropodi si presta bene come bioindicatore poiché è ubiquitaria, sensibile alle

alterazioni del suolo, ed ha un carattere estremamente conservativo perché dotata di scarsa mobilità (D'Avino *et al.*, 2002).

L'organismo test deve possedere determinate caratteristiche per essere impiegato in test ecotossicologici. In particolare: sensibilità agli inquinanti, relazione quantitativa tra la risposta biologica e le concentrazioni di esposizione ad un inquinante, ampia distribuzione nell'area di indagine, scarsa mobilità (nel caso di un test *in situ*), lungo ciclo vitale, uniformità genetica. Più organismi insieme possono essere utilizzati quali bioindicatori, in particolare modo quando i fenomeni inquinanti provocano variazioni misurabili a livello di ecosistema o di comunità. Le attività di bioindicazione possono essere condotte su vari livelli d'integrazione biologica; quindi ci si può riferire sia alle attività del singolo organismo sia ad una popolazione o comunità (Van Gestel *et al.*, 1996).

La tossicità di matrici complesse deve inoltre essere valutata mediante una batteria di bioindicatori, allo scopo di analizzare il più ampio spettro di effetti su organismi con risposte differenti ai vari composti presenti nelle matrici. Anche la misura di variabili biochimiche e fisiologiche ("biomarker") negli individui o nei loro prodotti d'escrezione, fornisce informazioni sull'esposizione o sul danno (McCarthy *et al.*, 1990). Ad esempio, le cellule geneticamente modificate possono essere impiegate per la rilevazione di sostanze (Aarts, 1995).

La forza di una analisi ecotossicologica risiede pertanto nella scelta accurata dei test da effettuare, degli organismi "chiave" da utilizzare e degli endpoints da valutare. Sarebbe opportuno, non conoscendo a priori le caratteristiche e probabile tipologia di contaminazione dei suoli, eseguire sempre uno screening conoscitivo con vari test, per poter meglio identificare la batteria idonea in un particolare studio

ecotossicologico. Per effettuare tale scelta è parimenti importante considerare la sensibilità dei singoli organismi alle particolari classi di contaminanti senza l'effetto "matrice". Per molti organismi e per alcune sostanze esiste in letteratura descritta una curva dose – risposta ottenuta in laboratorio, che permette di ipotizzare il comportamento dell'organismo in presenza di tali sostanze. La conoscenza di tali "curve di calibrazione" con le sostanze pure, su cui leggere la risposta tossica ottenuta nel campione naturale, permette di studiare e caratterizzare l'effetto della matrice o della manipolazione del campione (es. preparazione dell'estratto), così come la interazione con le altre sostanze presenti. Purtroppo per particolari classi di contaminanti tra cui gli IPA non esiste una ampia letteratura in proposito, soprattutto per la difficoltà nel controllo delle condizioni sperimentali.

### **3. La valutazione della tossicità**

La valutazione della tossicità è uno degli argomenti di discussione ed approfondimento più attuali non solo del mondo scientifico ma anche di quello politico amministrativo. Il problema di definire quanto è tossico un campione ambientale risulta il cardine principale su cui stabilire criteri qualitativi ed applicare programmi di bonifica e sanzioni amministrative. Se da una parte infatti, sono stati fatti numerosi sforzi per definire i criteri di selezione di un test ecotossicologico (Van Gestel *et al.* 1997), molto poco esiste sulla interpretazione dei risultati di batterie di test e sulla elaborazione di scale di lettura. Esiste pertanto l'esigenza di un indice sintetico che integri e rappresenti i risultati ottenuti in modo da renderli confrontabili nello spazio e nel tempo e fruibili per studi più ampi come la valutazione del rischio.

Il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, predisposto dal Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e recante Norme in materia ambientale, nell'Allegato 5 (Limiti di emissione degli scarichi idrici) alla parte Terza, Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche, dispone che per la valutazione dello stato ecologico sono obbligatori i test di tossicità acuta e che "in caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il caso peggiore". Il rilevamento di tossicità non è sanzionabile, ma comporta l'obbligo di approfondimento dell'indagine, di ricerca delle cause e della loro rimozione.

Nel caso delle acque la classificazione degli elementi biologici, della qualità idromorfologica e della qualità fisico-chimica è basata su una descrizione qualitativa. Lo stato chimico è definito in base alla media

aritmetica annuale delle concentrazioni delle sostanze pericolose, confrontate con apposite tabelle di valori limite. La valutazione complessiva dello stato ecologico delle acque superficiali è basata sul più basso dei valori riscontrati durante il monitoraggio biologico e fisico-chimico e si esprime su una scala cromatica (5 classi).

L'approccio ha due ovvie limitazioni: la prima, la soggettività delle classificazioni, basate su un criterio narrativo; la seconda, la scelta automatica del caso peggiore, che è estremamente conservativa e non consente un giudizio esperto basato sul "weight of evidence".

Nel D.Lgs 152/2006 il suolo è monitorato e tutelato principalmente in quanto matrice in cui risiede il corpo idrico o in senso più ampio in base alla sua destinazione di uso. Esiste piuttosto una legislazione per la tutela dei "siti". Un sito si definisce "inquinato" quando presenta livelli di contaminazione o alterazione chimica, fisica e biologica del suolo, sottosuolo, acque superficiali e sotterranee tali da determinare un pericolo per la salute pubblica o per l'ambiente naturale o costruito. Un sito si può definire contaminato quando uno o più valori di concentrazione delle sostanze tabulate nell'all. 1 del D.M. 471/99 (decreto applicativo della caratterizzazione, bonifica e messa in sicurezza di un sito contaminato) risulta superiore ai valori limite, oppure quando sussiste un pericolo concreto ed attuale di superamento (art. 4, co. 1).

Un sito si definisce "potenzialmente inquinato" quando, a causa di specifiche attività antropiche, passate o in atto, la concentrazione di una o più sostanze tossiche può superare i limiti imposti dal D.M. in tutte le matrici.

Il suolo, quindi, nonostante il suo ruolo fondamentale dal punto di vista ambientale, non è stato oggetto di ricerche adeguate per quanto

riguarda la definizione della sua qualità, in special modo da un punto di vista tossicologico.

La valutazione della qualità del suolo è generalmente basata sulla concentrazione degli inquinanti nel suolo e la loro comparazione con specifici valori soglia. Tuttavia la sola analisi chimica non è in grado di evidenziare la salute di un suolo. Infatti molti metaboliti intermedi ed alcuni contaminanti che sono presenti in basse concentrazioni, sebbene producano effetti negativi sugli organismi non possono essere identificati. Per valutare il reale rischio dei contaminanti le analisi chimiche devono essere integrate con saggi biologici ed ecotossicologici (Fent, 2003; Tsui and Chu, 2003; Robidoux *et al.*, 2004; Gruiz, 2005; Molnár *et al.*, 2005).

Per definire la tossicità delle matrici solide è necessario integrare non solo i risultati di una batteria di test ecotossicologici, ma anche i risultati provenienti dalle diverse matrici analizzate per ottenere un indice sintetico di tossicità.

Differenti approcci sono stati sviluppati per i sedimenti (Bombardier and Bermingham, 1999; Phillips *et al.*, 2001; Stronkhorst *et al.*, 2003) e gli effluenti (Costan *et al.*, 1993; Vindimian *et al.*, 1999) ma dalla consultazione della letteratura sull'argomento, non sembrano esistere degli studi di sviluppo ed applicazione di indici e scale per la definizione della tossicità dei suoli.

Nel Rapporto APAT, RTI CTN-AIM 4./2001 (APAT, 2001) Elementi per la caratterizzazione fisico chimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D. Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota, si richiama l'espressione della tossicità come EC<sub>50</sub> e come TI (Indice di Tossicità), espresso come  $100/EC_{50} = U.T.$  (Unità Tossiche). In esso si propone di stabilire una scala di tossicità basata sull'EC<sub>50</sub> per identificare 5 diverse classi (in quanto i D. Lgs

152/99, D. Lgs 258/00 ed D. Lgs 152/2006 suddividono i corpi idrici in cinque classi di qualità ambientale).

Ahlf *et al.*, (2005) hanno utilizzato per sedimenti (di acqua dolce) una batteria di 5 test, usando come endpoint la percentuale di inibizione rispetto al controllo. Per ciascun test viene fissata (arbitrariamente) la percentuale di inibizione per risposta bassa o nulla; moderata; forte. Le percentuali così stabilite possono essere anche molto diverse, per test ed organismi differenti, perché riflettono la diversa sensibilità e rilevanza dei diversi test (giudizio esperto).

L'indice Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP), per gli effluenti del St. Lawrence River Basin (Costan *et al.*, 1993), prevede che i risultati dei test vengano espressi come Threshold Concentrations (TEC), Concentrazioni Soglia di Effetto, cioè come media geometrica tra la concentrazione più bassa in una serie di diluizioni dello scarico alla quale si osservano effetti avversi sugli organismi (Lowest Observed Effects Concentration, LOEC) e la concentrazione più alta dello scarico che non produce effetto (NOEC). L'indice ovviamente può sovra- o sottostimare la tossicità acuta e cronica, letale o subletale, la genotossicità, ecc., in funzione delle combinazioni di endpoint dei test utilizzati (Environment Canada, 1993).

Bombardier and Bermingham (1999) si sono ispirati al PEEP per sviluppare SED-TOX, un indice specificatamente studiato per i sedimenti che tiene conto del livello trofico degli organismi utilizzati nei test di tossicità e delle vie di esposizione ai tossici. Infatti, prende in considerazione 4 fasi, acqua interstiziale, estratti organici, sedimento umido e sedimento intero, ma può includere anche gli elutriati. Partendo da Hartwell (1997) e dal successivo approccio di Phillips *et al.* 2001, il gruppo di lavoro della Commissione UNICHIM Qualità dell'acqua Gruppo di Lavoro Metodi Biologici, ha formulato

in via sperimentale un indice di tossicità per le acque (Baudo, comunicazione personale).

Brevemente: per calcolare il punteggio per un sito (o un campione), si usa un modello dove severità dell'effetto, grado della risposta, variabilità del test, consistenza tra test e numero di endpoint misurati, sono così combinati:

$$\text{Punteggio del sito} = \frac{\{\sum [(severità)(\% \text{ risposta})(CV)]\} + \{\text{consistenza}\}}{\sqrt{N}}$$

**Severità** della risposta. Dipende dall'effetto misurato dall'endpoint.

**Grado della risposta.** È in percentuale rispetto al valore medio del controllo, indipendentemente dalla significatività statistica (es., 5 % mortalità, 45 % riduzione della crescita, ecc.). Si parte dal presupposto che anche impatti di basso livello possono avere significativi effetti a livello di popolazione se estesi su vaste aree per lunghi periodi.

**Variabilità.** È il coefficiente di variazione tra le repliche del campione ed esprime la variabilità specifica del test per quel campione, ma comprende anche la variabilità sperimentale del momento.

La correzione della risposta (%) è basata sul confronto statistico campione – controllo mediante il test *t* di Student per varianze disuguali (che tiene conto cioè anche della variabilità per quello specifico campione e del controllo in quel momento) usando un coefficiente correttivo statistico *CCS*.

Si deve poi introdurre anche un **correttivo per i comparti**, moltiplicando la severità per i fattori del comparto (tenendo conto della rilevanza ecologica e della manipolazione dei campioni).

La **Consistenza** esprime il grado di accordo tra i vari endpoint: è alta se tutti i test concordano, ed è quindi alta anche la fiducia di poter identificare una situazione di rischio; la consistenza però diminuisce

se i risultati sono contraddittori o conflittuali, e quindi diminuisce anche la fiducia di identificare correttamente il grado di rischio.

$$\text{Consistenza} = [(N/2)-X]^3$$

dove N è il numero totale di endpoint e X il numero di endpoint statisticamente non significativi ( $P = 0,05$ ).

Complessivamente il calcolo diventa:

$$\text{Punteggio del campione} = (\{\sum [(severità) (CCS) (comparto) (\% \text{ risposta})]\} + \{\text{consistenza}\}) / \sqrt{N}$$

E per la tossicità:

$$\text{Punteggio tossicità} = \{\sum [(severità) (CCS) (comparto) (\% \text{ risposta})]\} / \sqrt{N}$$

Il confronto di questi due punteggi permette così di interpretare la tossicità in termini di rischio: se il campione presenta un effetto tossico e i diversi endpoint sono tra loro consistenti, il rischio è maggiore rispetto al caso con uguale punteggio, ma con endpoint tra loro discordanti.

Il punteggio del campione può essere letto in una scala 0-100 relativa alla batteria utilizzata utilizzando per ciascun endpoint la percentuale, relativa all'endpoint che dà la risposta massima (%) per la combinazione massima (severità · comparto · CCS) max della batteria considerata.

Il massimo corrisponde alla tossicità altamente significativa (CCS) per un test di rilevanza massima su comparto di massimo punteggio che ha dato una risposta del 100 % o relativamente la più elevata.

#### 4. Scopo della ricerca

L'obiettivo principale del presente lavoro di ricerca è la valutazione della relazione tra tossicità e contenuto di IPA nei suoli.

A tale scopo sono stati selezionati sette siti a diversa tipologia contaminazione da IPA. La valutazione della tossicità è stata effettuata mediante batterie di test ecotossicologici sia sul suolo tal quale sia sugli estratti acquoso ed organico. Allo scopo di definire l'efficienza di tali batterie di test nell'identificazione del grado di contaminazione, è stata valutata la sensibilità dei singoli organismi utilizzati e della tipologia di test effettuato. Un aspetto importante indagato è stato, inoltre, la comparazione della tossicità misurata con le varie matrici. E' stata quindi valutata la correlazione tra contenuto di IPA e tossicità per i suoli studiati. La tossicità è stata espressa come "caso peggiore" cioè come la massima tossicità misurata, per ogni matrice, dalla batteria di test. Tale approccio, tuttavia non tiene conto del giudizio esperto e risulta talvolta troppo conservativo. Nel tentativo di superare tale limite si è quindi elaborato un indice sintetico integrato TBI (Toxicity test Battery integrated Index) di tossicità per i suoli, seguendo il modello proposto in commissione UNICHIM (Baudo comunicazione personale). Tale indice è stato applicato in via sperimentale ai dati dello studio in oggetto. In tale maniera i risultati ottenuti, per ciascun campione, con le differenti matrici sono stati riuniti in un unico dato confrontabile spazio-temporalmente e valutabile su una scala di rischio tossicologico.

# Materiali e metodi

## 1. Campionamento dei suoli

I campionamenti di suolo superficiale (0-10 cm) sono stati effettuati a marzo 2005 in sette siti di diversa tipologia, quali: un'area industriale dismessa della periferia di Napoli (IA), un'area in prossimità della tangenziale, strada a scorrimento veloce, di Napoli (MW), due parchi urbani della città di Napoli (UP1 e UP2), due aree di un parco periurbano della città di Salerno (PW1 e PW2), ed un'area del Parco Nazionale del Vesuvio (RA). Quest'ultimo sito è stato considerato come sito di riferimento poiché distante circa 40 km dal centro della città di Napoli e pertanto scarsamente interessato da fonti di emissioni di IPA. I restanti siti di campionamento sono, invece, differentemente influenzati dal tipo e dall'entità dell'impatto antropico.

In ciascun sito i campioni di suolo sono stati prelevati da circa 10 punti (subcampioni) dopo la rimozione della lettiera. Per ciascun sito, i subcampioni sono stati mescolati al fine di formare un unico campione omogeneo. Poiché la copertura vegetale influenza fortemente le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo, i campioni di suolo sono stati prelevati alla base di alberi della stessa specie, il leccio, particolarmente diffusa nel territorio campano sia in ambienti naturali che urbani. In laboratorio, i campioni di suolo sono stati setacciati (2 mm).

## 2. Caratterizzazione dei suoli

I campioni di suolo sono stati caratterizzati per il tenore idrico (il contenuto di acqua nel suolo al momento del campionamento), per il contenuto di sostanza organica e per il pH. Per la determinazione del tenore idrico, 5 g di suolo fresco setacciato sono stati posti in stufa ventilata (75 °C) fino a raggiungimento di peso costante. Il tenore idrico è stato espresso come percentuale di peso secco di suolo. Per la determinazione del contenuto di sostanza organica, 5g di suolo secco sono stati posti in muffola a 500 °C per 2 h. Il contenuto di sostanza organica è stato determinato come differenza del peso prima e dopo l'incenerimento ed è stato espresso come percentuale del peso secco. Per la determinazione del pH, 10 g di suolo fresco sono stati posti in beute contenenti 25 ml di acqua distillata. Le beute sono state lasciate in agitazione per 20 min e dopo 10 min di sedimentazione è stato raccolto il surnatante sul quale è stata effettuata la misura del pH per via potenziometrica.

L'analisi granulometrica è stata effettuata trattando un'aliquota di ciascun campione tal quale (umido) con 250 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumi in modo da sciogliere la sostanza organica responsabile dell'aggregazione delle particelle fini. Successivamente ciascun campione è stato filtrato in umido su un setaccio da 63 µm. La frazione di campione trattenuta dal setaccio è stata raccolta in un contenitore di plastica, lasciata asciugare in stufa a 30 °C e setacciata meccanicamente tramite una pila di setacci. La frazione inferiore a 63 µm è stata lasciata decantare per permettere a tutte le particelle di sedimentare; si è quindi proceduto alla rimozione della frazione acquosa e all'essiccamento del residuo solido in stufa alla temperatura di 40 °C. Il residuo secco è stato quartato per separarne 2.5 g che sono

stati quindi dispersi in una soluzione di sodio-esametafosfato (0.5 g/L) allo scopo di favorire la dispersione del campione, in quanto condizione essenziale per una corretta analisi granulometrica è la separazione delle singole particelle del sedimento. L'effetto disperdente del sodio-esametafosfato è esercitato dagli ioni fosfato, che legandosi agli spigoli delle argille, neutralizzano le cariche positive e ne impediscono il legame alle cariche negative dei pacchetti dei minerali argillosi. Il campione così ottenuto è stato sottoposto ad analisi granulometrica con Sedigrafo (Micrometrics Sedigraph 5100). Il campione disperso viene introdotto in una camera di mescolamento dove è mantenuto in agitazione fino al momento dell'analisi per favorirne l'omogeneizzazione; a quel punto viene trasferito in una cella avente pareti piatte e trasparenti (Analysis Cell) dove ha inizio la sedimentazione gravitativa delle particelle.

### **3. Test ecotossicologici**

#### **Matrici utilizzate**

I test ecotossicologici sono stati condotti su tre matrici: suolo tal quale, estratto acquoso, estratto organico.

#### *Suolo tal quale*

I campioni di suolo setacciati (2 mm) sono stati conservati al buio ed a 4 °C.

#### *Estratto acquoso*

L'elutriato è stato ottenuto seguendo la procedura US-EPA (1991), a partire dai campioni di suolo aliquotati e conservati a 4 °C al buio.

Il campione di suolo è stato diluito con 3 parti di acqua ultrapura (Milli-Q). Il peso del suolo utilizzato per la preparazione dell'elutriato è equivalente a quello del peso secco. La sospensione è stata sottoposta ad agitazione continua mediante agitatore magnetico per 30 min e lasciata decantare a 4 °C per 24 h. La fase liquida è stata separata dalla fase solida mediante aspirazione.

L'elutriato è stato utilizzato entro 24 h dalla sua preparazione.

#### *Estratto organico*

La frazione liposolubile (corrispondente a 10 gr di suolo secco) viene estratta con 20 mL di acetone per due volte, seguita da 20 mL di acetone:esano (1:1) e da 20 mL di esano. L'estratto è stato trasferito in un imbuto separatore ed sono stati aggiunti circa 20 mL di acqua. Successivamente la fase esanica è stata fatta percolare su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per eliminare l'acqua residua, miscelata con l'estratto organico della fase liquida (Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) e portata a volume finale di 100 mL con esano. I solventi sono stati allontanati in un rotovapor mediante un flusso di N<sub>2</sub>. Infine, il residuo secco è stato risospeso in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO) puro per analisi.

#### **Test ecotossicologici con estratti acquoso ed organico**

La batteria di test ecotossicologici condotta con l'estratto acquoso ed organico dei suoli è composta da: test di tossicità acuta con *Vibrio fischeri*, test di tossicità cronica con *Selenastrum capricornutum* e dal test di tossicità acuta con *Daphnia magna*.

I saggi effettuati con gli estratti organici utilizzano la soluzione standard (la stessa utilizzata per l'allevamento) all' 1% di DMSO in tutta la filiera analitica (compreso il controllo). L'estratto organico è testato ad una concentrazione massima dell' 1% v/v. Tale necessità

nasce dalla considerazione che il DMSO non presenta tossicità alla concentrazione inferiore o uguale all'1% v/v.

*Test di tossicità acuta con Vibrio fischeri*

Il test valuta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa da una popolazione di batteri marini appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, dopo un tempo di esposizione al campione di 5, 15 e 30 min (Steinberg *et al.*, 1995; ISO, 1998). Il test è stato condotto utilizzando il sistema Microtox<sup>®</sup> introdotto dalla Beckman Instruments nel 1981 (Microbics Corporation, Carlsbad, Ca, USA). La procedura utilizzata ha previsto la correzione del campione con una soluzione al 22% di NaCl, per incrementare la pressione osmotica (Osmotic Adjustment Solution, OAS), una diluizione seriale (1:2) in cuvette di vetro, utilizzando il Microtox<sup>®</sup> - Diluent: una soluzione al 2% di NaCl utilizzata anche per il controllo, ed infine l'esposizione di 100 µL di batteri (circa  $1 \cdot 10^6$ ) a 900 µL del campione diluito. Tutti i test sono stati condotti almeno in duplicato.

E' stata effettuata una lettura della bioluminescenza a 5, 15 e 30 min a partire dall'esposizione dei batteri.

I dati sono elaborati statisticamente dal software che gestisce lo strumento (Microbics Corporation, Carlsbad, CA, USA).

*Test di tossicità cronica con Selenastrum capricornutum*

Questo test di tossicità consiste nell'esposizione di una popolazione algale, in fase esponenziale di crescita, al campione da analizzare. Dopo 96 h di incubazione viene misurata la crescita nel campione e confrontata con quella ottenuta nel controllo. Il protocollo sperimentale utilizza le metodologie EPA (EPA, 1985) e ARPAT (ARPAT, 1998).

I saggi di tossicità con gli estratti acquosi dei suoli con *S. capricornutum* sono proposti in numerose pubblicazioni e metodi ufficiali (EPA, 1978; Joubert, 1983; EPA, 1985; APHA-AWWA-WEF, 1982; Sbrilli *et al.* 1998; Sbrilli, 2000).

La procedura prevede l'aggiunta a 100 mL di campione di 100  $\mu$ L di una soluzione di micronutrienti composta dalle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5 (EPA, 1978; EPA, 1985):

**Tabella 3.1.** Soluzioni componenti la soluzione di micronutrienti per il saggio algale con *S. capricornutum*

Soluzione	Composto	Concentrazione
1	NaNO <sub>3</sub>	25,5 gr/L
2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14,7 “
3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,04 “
4	NaHCO <sub>3</sub>	15 “
5	MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	12,46 mg/L
	CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	4,41 “
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185,52 “
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	207,81 “
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	160 “
	ZnCl <sub>2</sub>	3,27 “
	CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	1,428 “
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,012 “
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7,26 “

Il controllo viene effettuato con acqua ultrapura (Milli-Q). I 100 mL del campione e del controllo vengono divisi in 3 repliche da 25 mL alle quali si aggiunge l'inoculo algale (preparato 24 h prima), in modo tale da avere nei 25 mL una concentrazione di 1000 cellule/mL;

Dopo 96 h di incubazione a 25 °C con illuminazione continua pari a 4000 lux si stima, al microscopio (ZEISS-MC80) con l'ausilio di una camera di Burkner, la densità cellulare di ogni campione. La crescita

algale rappresenta la misura della massima velocità di crescita in un periodo di 96 h.

#### *Preparazione dell'inoculo algale*

L'inoculo algale è una quantità standardizzata di sospensione cellulare a concentrazione nota e costante; esso si prepara dalla coltura di mantenimento, nella fase di crescita esponenziale (questo avviene quando la coltura algale ha circa una settimana di vita). Si prelevano due aliquote di 50 mL e si centrifugano a 2000 rpm per 10 min. Si aspira il supernatante e si sospendono le alghe in una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> 15 mg/L al fine di eliminare eventuali tracce di terreno di coltura. Dopo 24 h si procede alla conta algale con la camera di Burker al microscopio, per determinare la concentrazione della sospensione ottenuta. La procedura del test prevede l'aggiunta di 1000 cellule/mL (Sbrilli *et al.*, 1998; Rampa *et al.*, 2000; Sbrilli, 2000).

#### *Test di tossicità acuta con Daphnia magna*

Il test con *D. magna* consiste nell'esposizione di un numero limitato di organismi neonati al campione e nella valutazione della morte o immobilizzazione dopo 24-48 h di esposizione, come indice di effetto tossico acuto rispetto al controllo (Marchetti *et al.*, 1991).

*D. magna* è un crostaceo planctonico di acqua dolce, appartenente all'ordine dei cladoceri, che si riproduce per partenogenesi sotto specifiche condizioni ambientali. I dafnidi, riprodotti per partenogenesi, presentano lo stesso corredo genetico e quindi la stessa resistenza alle sostanze inquinanti (Bernardi, 1991; Marchetti *et al.*, 1991). La procedura del test di tossicità (OECD, 2004) prevede l'utilizzo di organismi con meno di 24 h di vita poiché questo è ritenuto lo stadio più sensibile. Pertanto 24 h prima dell'esecuzione

del test, daphnie adulte, che presentano uova, vengono trasferite in acqua di allevamento pulita e rifornite di cibo.

Il test è effettuato in piastre trasparenti di policarbonato dotate di pozzetti, all'interno dei quali si distribuiscono 10 mL del campione in 3 repliche. In ogni pozzetto si trasferiscono 5 individui. Le piastre sono incubate al buio a  $20 \pm 2$  °C; durante il test gli organismi non sono alimentati. Dopo 24 e 48 h viene contato il numero di vivi e/o dei mobili durante il periodo di osservazione di 15 sec.

Per accettare i dati è necessario che nel controllo il numero degli immobili sia inferiore o uguale al 10% (Marchetti *et al.*, 1991; Daphtoxkit F<sup>TM</sup>, 2000).

### **Test ecotossicologici con il suolo tal quale**

La batteria di test condotta con il suolo è composta da: test di tossicità acuta con *Vibrio fischeri*, test di fitotossicità con *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* e *Sorghum saccharatum*, test di tossicità acuta e cronica con *Heterocypris incongruens*.

#### *Test di tossicità acuta con Vibrio fischeri*

Nel caso del suolo intero si applica la procedura standard del “Solid Phase Test” (SPT). Una quantità di suolo fresco equivalente a 7 gr di suolo secco viene sospeso in 35 mL di diluente SPT e sottoposto ad agitazione per 10 min; successivamente si prelevano 1,5 mL della sospensione e si aggiungono a 1,5 mL di diluente SPT. Si effettuano 8-12 diluizioni seriali con fattore=2 in speciali provette SPT e si lasciano a  $15 \pm 2$  °C per 20 min si aggiungono quindi 20 µL di reagente Microtox<sup>®</sup> contenente i batteri e si miscela il campione per indurre il contatto tra batterio e matrice solida; dopo 20 min si separa la fase acquosa con i batteri dalla matrice solida mediante l'utilizzo di

filtri a colonna SPT; la lettura della bioluminescenza viene effettuata su 500  $\mu$ L di campione a 5, 15 e 30 min a partire dallo scadere dei 20 min di contatto dei batteri con il campione test.

*Test di fitotossicità con *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* e *Sorghum saccharatum**

Il test permette di valutare la germinazione e l'accrescimento radicale dopo 72 h, (EPA 1996; APAT, 2004) delle dicotiledoni: *Lepidium sativum* (crescione) e *Sinapis alba* (senape); e della monocotiledone *Sorghum saccharatum* (sorgo). Il saggio fa uso di un suolo artificiale come controllo negativo (OECD, 1984). Esso è composto da: sabbia quarzosa al 70%, argilla al 20% contenente non meno del 30% di caolinite e torba di sfagno al 10%.

Una quantità di suolo fresco equivalente a 10 gr di suolo secco viene distribuito omogeneamente in una piastra Petri e viene coperto con carta da filtro n°1 (Whatman), si aggiunge una quantità d'acqua ultrapura necessaria per raggiungere il 100 % di ritenzione idrica più altri 5 mL; si dispongono quindi casualmente 10 semi. Il test viene condotto in triplicato. Le piastre Petri di ciascun campione/controllo si dispongono in pila e si racchiudono in un sacchetto di polietilene per alimenti (per evitare possibili contaminazioni incrociate da eventuali inquinanti volatili e per minimizzare l'evaporazione dell'acqua) e quindi si incubano al buio ad una temperatura di  $25 \pm 2$  °C per 72 h in un termostato non ventilato.

Entro non oltre 2 h dal termine del test, per ciascuna replica viene conteggiato il numero di semi germinati (mostranti radici lunghe almeno 1 mm). Con l'ausilio di una carta millimetrata e di due pinzette si misura la lunghezza delle radici con approssimazione al mm più vicino.

I risultati sono espressi come Indice di Germinazione percentuale (IG%) che tiene conto sia della germinazione che dell'accrescimento radicale:

$$IG\% = (IG_{\text{campione}}/IG_{\text{controllo}}) \cdot 100$$

L'indice di geminazione è dato dal prodotto tra la media dei semi germinati e la media della lunghezza delle radici (media delle lunghezze radicali medie, in una piastra).

$$IG = L \cdot n$$

dove "L" rappresenta la media della lunghezza radici, ed "n" il numero medio dei semi germinati.

#### *Test di tossicità acuta e cronica con *Heterocypris incongruens**

Il saggio consiste nell'esposizione di neonati, ottenuti da cisti, di *H. incongruens* alla matrice solida per 6 giorni per valutare la percentuale di morte (effetto acuto) e l'inibizione della crescita (effetto cronico) rispetto ad un controllo.

La schiusa delle cisti è stata realizzata in piastre Petri con 10 mL di Standard Freshwater (SF) a  $25 \pm 2$  °C per 52 h in condizioni di illuminazione continua (circa 3000 lux). Dopo 48 h dall'inizio della schiusa si effettua un pre-feeding con l'alga *Spirulina sp.* e si prosegue l'incubazione a  $25 \pm 2$  °C per altre 4 h.

**Tabella 3.2.** Standard Freshwater utilizzata per *H. incongruens* (Weber, 1993).

	Mg/L
MgSO <sub>4</sub>	60
NaHCO <sub>3</sub>	96
KCl	4
CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	60

La procedura utilizzata (Chial *et al.*, 2002, modificata) prevede la esposizione di 10 organismi neonati con lunghezza compresa tra i 200

e 250 µm all'equivalente di 400 mg di suolo secco e di 4 mL di SF mescolato e fatto decantare per 20 min; il nutriente è costituito da una popolazione di *S. capricornutum* con una concentrazione finale pari a  $1,5 \cdot 10^7$  cellule/mL. Le piastre sono incubate per 6 giorni a  $25 \pm 2$  °C. Il test viene condotto in sestuplicato.

Al termine del periodo di incubazione i sopravvissuti si trasferiscono in piastra multipozzetto con parete a fondo sottile sia per la conta sia per la misura della loro lunghezza. La misurazione viene effettuata mediante l'utilizzo di una scala graduata di 50 µm sotto ingrandimento di uno stereomicroscopio. Per la lettura dei risultati, gli ostracodi vengono immobilizzati mediante una goccia di fissativo Lugol (Fluka, Germany). I risultati sono espressi sia come percentuale di morti (effetto acuto) sia come percentuale di inibizione della crescita (effetto cronico) rispetto al controllo (OECD, 1984).

### **Espressione dei risultati**

I risultati dei saggi ecotossicologici sono espressi come Unità Tossiche (UT), dove  $UT = 100/EC_{50}$  secondo il concetto di Sprague (Sprague *et. al.*, 1965).

L' $EC_{50}$  (Median Effective Concentration) che rappresenta la concentrazione di campione che provoca il 50% di effetto. è stata determinata utilizzando la procedura EPA (EPA, 1993).

Laddove non è stato possibile calcolare l' $EC_{50}$  è stata riportata la % di effetto massima osservata:

$$\%Effetto = \frac{X_{controllo} - X_{campione}}{X_{controllo}} \cdot 100$$

I risultati dei test effettuati con la matrice solida o con gli estratti acquosi sono espressi come  $gr_{(peso\ secco)}/L$ . In alcuni casi, gli estratti

organici sono espressi come percentuale del volume di campione rispetto al volume totale impiegato nel test.

I test effettuati con due o più repliche esprimono risultati mediati secondo l'equazione:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

L'incertezza è stata espressa con la deviazione standard ( $\sigma$ ) e l'errore relativo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$Err.rel. = \left( \frac{\sigma_{controllo}}{\bar{X}_{controllo}} + \frac{\sigma_{campione}}{\bar{X}_{campione}} \right) \% Effetto$$

#### 4. Analisi statistica

Il set di dati è stato processato mediante test statistici utilizzando il pacchetto Sigma-Stat 3.0 (Jandel Scientific, USA). Le relazioni tra la concentrazione di IPA sia come contenuto totale che percentuale delle varie frazioni, ed i risultati dei test ecotossicologici sono state valutate mediante il test di Pearson.

## 5. Indice di rischio ecotossicologico

Partendo dalla procedura del gruppo di lavoro Unichim (Baudo, personal communication) e descritta nell'Introduzione, è stato creato un indice sperimentale per la classificazione dei suoli sulla base dei risultati di test ecotossicologici con differenti matrici: il Toxicity test Battery integrated Index (TBI).

La % di effetto ottenuta per ciascun endpoint dal campione non diluito (per il suolo tal quale) e dall'estratto non diluito preparato seguendo la metodica riportata, è stata corretta come Score test Endpoint ( $SE_i$ ) utilizzando i criteri seguenti:

- Comparazione statistica con il controllo (SCF, Statistical Correction Factor) (Tab. 5.1);
- Introduzione di fattori di correzione in base alla Matrice (M) e alla Severità dell'endpoint (S) legati al giudizio esperto (Tab. 5.2):

$$SE_i = \%E (M S) SCF$$

$SE_i$  potrebbe essere letto in una scala 0-100 relativa alla batteria di test utilizzata nel modo seguente:

$$\%SE_i = SE_i (\%E_m / SE_{max})$$

dove ( $\%E_m$ ) è la massima % effetto osservata corrispondente al massimo M S ottenuto e  $SE_{max}$  è il massimo Score test Endpoint calcolato.

Pertanto il Toxicity test Battery integrated Index (TBI) sarà:

$$\% TBI = (\sum \% SE_i) / N ,$$

dove N = Numero di endpoints

L'indice TBI può essere usato per calcolare la percentuale di rischio ecotossicologico ( $\%R$ ) nel modo seguente:

$$\%R = \%TBI (\Sigma \%SE_i + C) / \Sigma \%SE_i$$

dove C (Consistenza) =  $[N/2-X]^3$  e X = numero di endpoints statisticamente non significativi.

Il TBI può essere utilizzato inoltre per definire una scala di rischio ecotossicologico (Tab. 5.3).

**Tabella 5.1.** Fattore di correzione statistica basato sulla comparazione campione controllo usando il test *t* di Student  
\* p<0,05;\*\* p<0,01.

Campione- controllo	SCF
Nessuna differenza	0
Biostimolazione significativa*	1
Biostimolazione altamente significativa**	2
Tossicità significativa *	3
Tossicità altamente significativa**	4

**Tabella 5.2.** Severità assegnata alle diverse matrici (A) ed ai diversi endpoints (B) per il calcolo del TBI.

A		B	
Matrice(M)		Endpoint (S)	
Suolo tal quale	3	Mortalità	5
Estratto acquoso	2	Germinazione	4
Estratto organico	1	Crescita algale	3
		Accrescimento	2
		Allungamento radicale	2
		Bioluminescenza	1

**Tabella 5.3.** Scala di rischio ecotossicologico

<b>TBI</b>	<b>C<sup>a</sup></b>	<b>Rischio Ecotossicologico</b>
$TBI \leq 5\%$		Non significativo
$5\% < TBI \leq 20\%$	$C \leq 0$	Basso
$5\% < TBI \leq 20\%$	$C > 0$	Medio
$20\% < TBI \leq 50\%$		Alto
$TBI > 50\%$		Molto alto
<sup>a</sup> Consistenza		

# Risultati

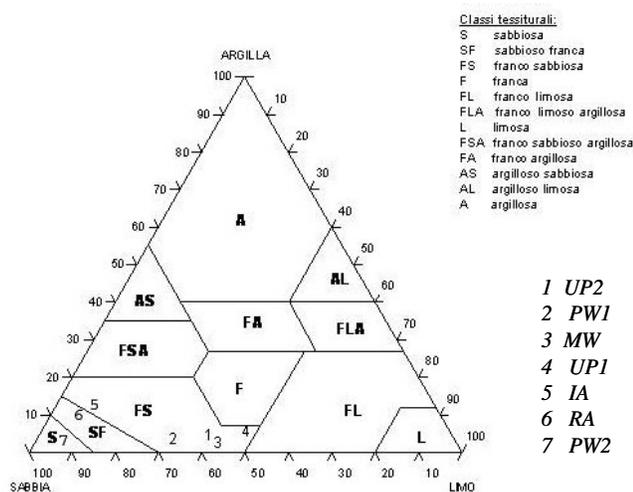
## Caratterizzazione chimica e fisica

I suoli sono stati caratterizzati per contenuto di sostanza organica, pH e tenore idrico. Il contenuto di sostanza organica varia tra 8.9 and 36.9 % p.s. (Tab. 1), con il valore più basso in uno dei boschi periurbani (PW2) ed il più elevato in uno dei parchi urbani (UP1). Il tenore idrico presenta un andamento tra i siti paragonabile a quello del contenuto di sostanza organica (Tab. 1). Il pH dei suoli varia da sub acido a sub alcalino (Tab.1).

**Tabella 1.** Valori medi ( $\pm$  d.s.) di tenore idrico (% p.s.), pH e contenuto di sostanza organica (% p.s.) dei suoli studiati.

	Sostanza organica	Tenore idrico	pH
RA	18.55 $\pm$ 0,40	39.81 $\pm$ 0,77	6.37 $\pm$ 0.04
IA	21.37 $\pm$ 1.32	42.55 $\pm$ 0.33	8.10 $\pm$ 0.21
UP1	36.86 $\pm$ 0.44	81.59 $\pm$ 0.7	7.17 $\pm$ 0.04
UP2	15.40 $\pm$ 0.28	41.25 $\pm$ 0.37	6.88 $\pm$ 0.03
MW	13.36 $\pm$ 0.37	37.50 $\pm$ 0.51	6.03 $\pm$ 0.04
PW1	14.82 $\pm$ 0.53	37.14 $\pm$ 0.25	7.63 $\pm$ 0.04
PW2	8.91 $\pm$ 1.41	22.10 $\pm$ 1.62	7.84 $\pm$ 0.23

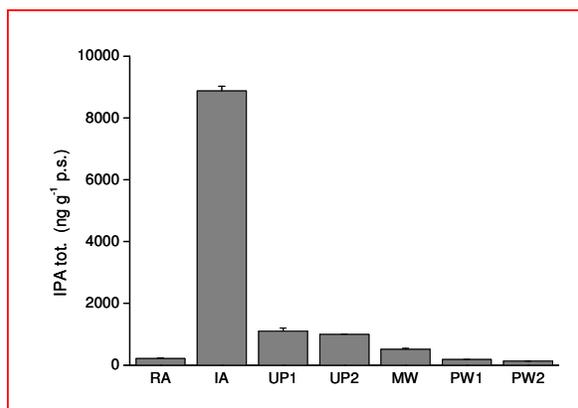
Da un punto di vista granulometrico tutti i suoli analizzati sono risultati franco-sabbiosi con l'eccezione dell'area remota (RA) e di PW2 che sono risultati sabbioso-franco e sabbioso, rispettivamente (Fig. 1).



**Figura 1.** Classi tessiturali dei suoli studiati (criterio USDA).

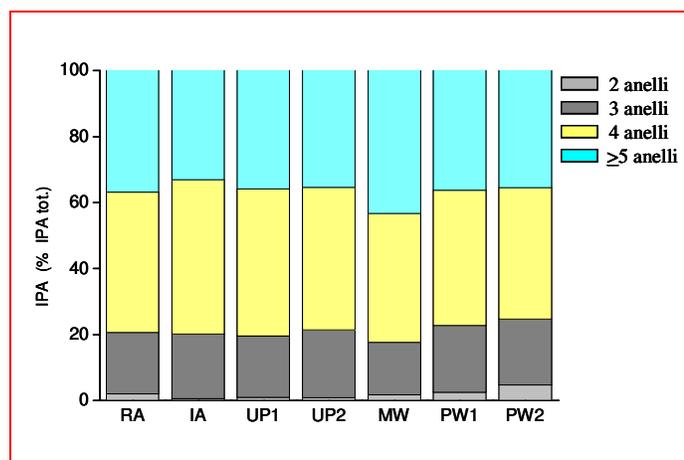
### Contenuto di IPA

La concentrazione totale di IPA misurata al sito RA è di circa 200 ng g<sup>-1</sup> p.s., valore comparabile con quelli ottenuti per i boschi periurbani (Fig. 2). La concentrazione totale di IPA misurata nei siti urbani (UP1, UP2 e MW) varia tra circa 500 e 1100 ng g<sup>-1</sup> p.s., mentre nell'ex area industriale (IA) è circa 9000 ng g<sup>-1</sup> p.s. (Fig. 2).



**Figura 2.** Valori medi ( $\pm$  e.s.) della concentrazione totale di IPA misurata nei suoli oggetto di studio.

Il contributo percentuale degli IPA con lo stesso numero di anelli benzenici alla concentrazione totale degli IPA indagati è pressoché simile per i singoli siti di campionamento. In particolare, gli IPA a 4 e 5 anelli contribuiscono in misura maggiore, mentre quelli a 2 anelli in misura minore (Fig. 3).



**Figura 3.** Contributo percentuale alla concentrazione totale degli IPA a 2 anelli, IPA a 3 anelli, IPA a 4 anelli ed IPA  $\geq 5$  anelli, nei suoli studiati.

### Test ecotossicologici

#### *Tal quale*

Tra i test ecotossicologici effettuati con il suolo tal quale solo quelli di fitotossicità, condotti con le specie *S. alba*, *S. saccharatum* e *L. sativum*, hanno mostrato evidenti effetti tossici in tutti i siti esaminati (Tab. 2). In particolare *S. alba* e *S. saccharatum* hanno evidenziato gli effetti tossici maggiori rispettivamente in RA e MW. UP2 e MW sono risultati i siti più tossici considerando la batteria di test di fitotossicità utilizzata sul suolo intero.

**Tabella 2.** Risultati dei test ecotossicologici ( $\pm$ d.s.) effettuati sul suolo tal quale dei siti oggetto di studio.

	RA	IA	UP1	UP2	MW	PW1	PW2
<b>Test Microtox<sup>®</sup></b>							
<b>Unità Tossiche</b>	46.00 $\pm$ 4.9	30.0 $\pm$ 3.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
<b>Test Ostracodi</b>							
<b>% mortalità</b>	10.0 $\pm$ 2.3	13.0 $\pm$ 3.1	0	0	8.0 $\pm$ 1.9	-	68.0 $\pm$ 15.0
<b>% inibizione</b>	0	-	0	4.7 $\pm$ 1.5	4.8 $\pm$ 1.6	-	27.9 $\pm$ 10.8
<b>Test fitotossicità % IG</b>							
<i>S. alba</i>	42.8 $\pm$ 10.5	38.0 $\pm$ 17.8	12.1 $\pm$ 2.0	28.1 $\pm$ 11.9	37.5 $\pm$ 14.5	28.4 $\pm$ 12.8	19.0 $\pm$ 7.3
<i>S.saccharatum</i>	14.6 $\pm$ 4.8	12.0 $\pm$ 2.9	11.7 $\pm$ 1.9	35.3 $\pm$ 5.8	49.0 $\pm$ 8.6	19.8 $\pm$ 7.2	23.7 $\pm$ 6.0
<i>L. sativum</i>	12.3 $\pm$ 1.6	12.0 $\pm$ 1.6	20.9 $\pm$ 3.1	28.3 $\pm$ 10.8	26.3 $\pm$ 7.0	0	33.1 $\pm$ 5.8
- Dati non disponibili							

Il test Microtox<sup>®</sup> identifica in RA e IA i siti di maggiore tossicità, gli altri siti hanno esercitato invece tossicità comparabili.

Il saggio con gli ostracodi ha fatto registrare principalmente effetti acuti, con il valore più elevato in PW2; inoltre tale suolo ha esercitato effetti cronici anche se di minore entità. Nel caso di UP2 è stato riscontrato solo un debole effetto tossico (Tab. 2).

#### *Estratto acquoso ed Estratto organico*

Tutti i test effettuati con gli estratti organici di suolo hanno mostrato effetti tossici in tutti i siti di campionamento. La tossicità più elevata è stata evidenziata nel sito IA (Tab. 3) sia mediante il test acuto con *D. magna* che con il saggio algale (test cronico). Per i parchi periurbani sono stati ottenuti i valori di tossicità complessivamente più bassi. A differenza dei test condotti su estratto organico, quelli condotti su estratto acquoso non hanno mostrato sempre effetti tossici. Infatti, per

gli estratti acquosi dei suoli il test Microtox<sup>®</sup> ed il test acuto con *D. magna* hanno evidenziato effetti tossici solo nei siti UP1 e PW2, rispettivamente (Tab. 3). Il test condotto con *S. capricornutum*; ha mostrato solo in un sito un valore nullo, mentre in tutti gli altri siti ha mostrato effetti tossici, con il valore più elevato a IA (Tab. 3).

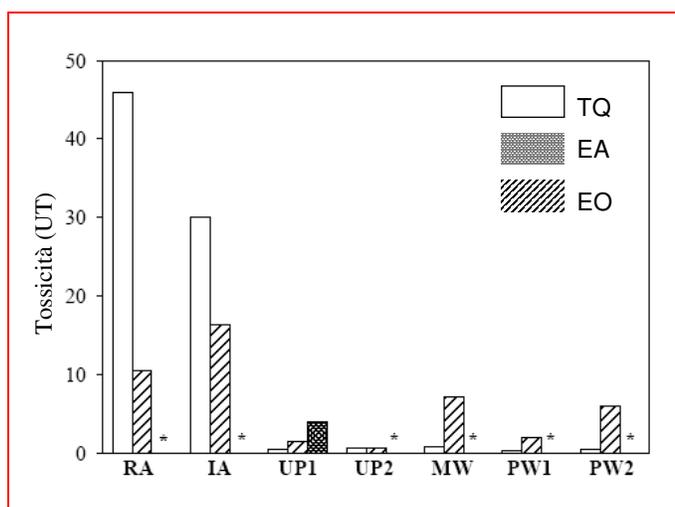
**Tabella 3.** Effetti tossici (UT  $\pm$  d.s.) ottenuti con gli estratti acquoso (EA) ed organico (EO) dei suoli oggetto di studio.

	Microtox <sup>®</sup> test		<i>D. magna</i>		<i>S. capricornutum</i>	
	EO	EA	EO	EA	EO	EA
<b>RA</b>	10.5 $\pm$ 1.4	0	4.2 $\pm$ 1.4	0	4.8 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.9
<b>IA</b>	16.4 $\pm$ 6.2	0	62.5 $\pm$ 6.2	0	50.0 $\pm$ 2.3	11.8 $\pm$ 0.2
<b>UP1</b>	1.5 $\pm$ 0.9	4.0 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.2	0	13.0 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.5
<b>UP2</b>	0.7 $\pm$ 0.1	0	1.9 $\pm$ 0.2	0	16.0 $\pm$ 2.3	1.9 $\pm$ 0.2
<b>MW</b>	7.2 $\pm$ 0.5	0	4.0 $\pm$ 0.8	0	5.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.2
<b>PW1</b>	2.0 $\pm$ 0.7	0	1.9 $\pm$ 0.2	0	6.6 $\pm$ 0.9	1.7 $\pm$ 0.1
<b>PW2</b>	6.0 $\pm$ 0.8	0	3.6 $\pm$ 1.2	3.2 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.2	0

#### Comparazione diverse matrici

Il test Microtox<sup>®</sup> è stato l'unico a poter essere condotto su tutte le matrici (suolo tal quale, estratto organico ed estratto acquoso), pertanto è l'unico test che può fornire indicazioni utili sulla tossicità delle singole matrici mediante lo stesso tipo di organismo. In figura 4 sono rappresentati i risultati dei test Microtox<sup>®</sup> condotti sul suolo tal quale e sugli estratti acquoso ed organico per tutti i siti studiati. Dal confronto dei dati ottenuti tra le diversi matrici si evidenzia che le più elevate tossicità sono state ottenute per il suolo tal quale seguite dagli estratti organici ad RA e IA, dove, tuttavia, non è stata rilevata alcuna

tossicità per gli estratti acquosi. Nei suoli MW, PW1 e PW2 è stata misurata la più alta tossicità per gli estratti organici e una leggera tossicità sul tal quale; non è stato invece ottenuto alcun effetto tossico per gli estratti acquosi. Contrariamente, l'estratto acquoso del suolo UP1 ha fatto registrare la più elevata tossicità in confronto alla leggera tossicità evidenziata nelle altre due matrici. Nel sito UP2 è stata misurata una debole tossicità sia per l'estratto organico che per il suolo tal quale.

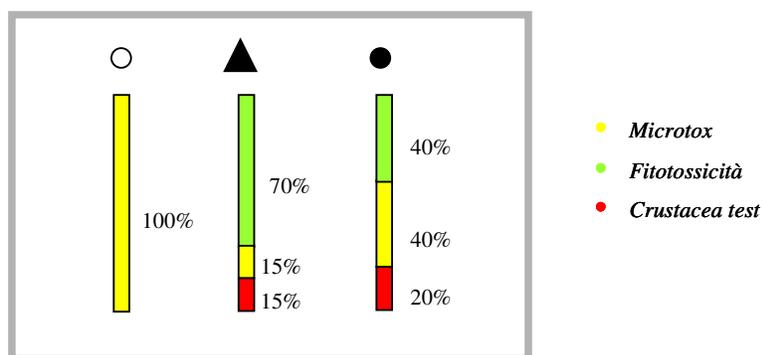


**Figura 4.** Effetti tossici (UT) misurati per le differenti matrici: Tal Quale (TQ), Estratto Acquoso (EA) ed Estratto Organico (EO) con il test Microtox®. \* valori nulli.

#### Sensibilità dei test ecotossicologici

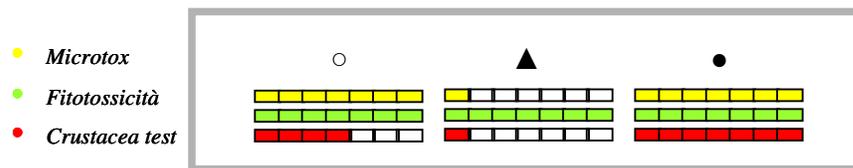
Il test che ha rappresentato spesso il caso peggiore (cioè il valore di tossicità più elevato della batteria di test in ciascuna matrice) per le singole matrici è quello condotto con *V. fischeri*, con il 100% delle volte per il suolo tal quale (Fig. 5). Per l'estratto acquoso, sono i test

di fitotossicità, in particolare quello condotto con *S. capricornutum*, a far registrare il maggior numero delle volte il caso peggiore. Per l'estratto organico, il saggio algale con *S. capricornutum* ed il test con il batterio hanno fatto registrare lo stesso numero di volte la più elevata tossicità (Fig. 5). Il caso peggiore non è mai rappresentato da *H. incongruens* (Fig. 5).



**Figura 5.** Frequenza dell'identificazione del caso peggiore da parte delle categorie di organismi test utilizzati, nelle matrici: tal quale (○) estratto acquoso (▲) ed estratto organico (●).

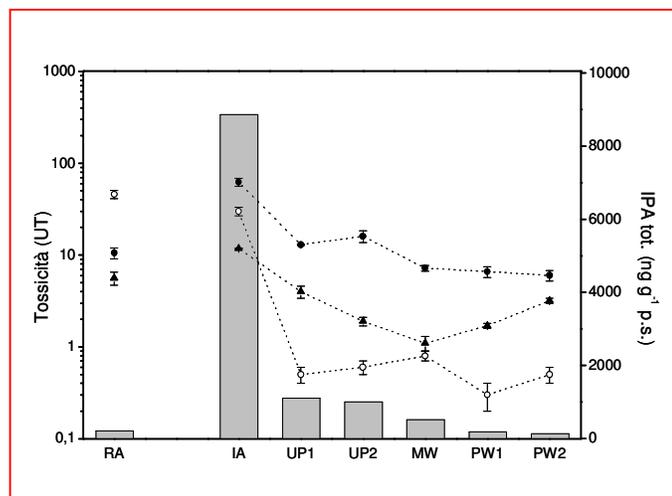
Ordinando i risultati da un punto di vista qualitativo, cioè riportando solo la presenza o meno di tossicità nelle differenti matrici dei suoli analizzati, con i differenti test effettuati, è possibile evidenziare che i test di fitotossicità (test con l'alga *S. capricornutum* e con i semi di *L. sativum*, *S. saccharatum* e *S. alba*) sono gli unici che hanno sempre risposto su tutte le matrici analizzate (Fig. 6).



**Figura 6.** Frequenza delle risposte da parte delle categorie di organismi test utilizzati, nelle matrici: tal quale (○) estratto acquoso (▲) ed estratto organico (●) per i singoli siti rappresentati dai rettangolini.

#### Relazione tra tossicità e concentrazione totale IPA

Nelle tre matrici, il caso peggiore e la concentrazione totale di IPA hanno mostrato un andamento spaziale simile, ad eccezione di RA (Fig. 7). Per i siti urbani ed industriale, i valori più elevati del caso peggiore sono rappresentati dall'estratto organico, mentre i più bassi dal suolo tal quale con l'unica eccezione dell'ex area industriale dove i valori più bassi sono rappresentati dall'estratto acquoso. Nell'area remota il valore più elevato di tossicità è stato registrato per il suolo tal quale, e gli effetti registrati dagli estratti sono comparabili a quelli delle aree urbane.



**Figura 7.** Relazione tra le concentrazioni totali degli IPA e la massima tossicità (log UT  $\pm$  ds) delle batterie di test ecotossicologici applicate alla matrice tal quale (○) all'estratto acquoso (▲) ed all'estratto organico (●) per i suoli oggetto di studio.

#### Correlazioni tra IPA e tossicità

In tabella 4 sono riportate le correlazioni statisticamente significative tra la concentrazione di IPA sia come contenuto totale che percentuale delle varie frazioni, ed i risultati dei test ecotossicologici.

Nel suolo tal quale gli effetti tossici sugli ostracodi, con entrambi gli endpoints misurati, sono risultati correlati con il contributo percentuale degli IPA a 2 anelli, e gli effetti fatti registrare da *S. saccharatum* con quello degli IPA a 5 anelli (Tab. 4).

Negli estratti organici ed acquosi del suolo il caso peggiore è correlato statisticamente con il contenuto totale di IPA ed anche con il contenuto percentuale di IPA a 4 anelli. Lo stesso risultato è stato evidenziato con il saggio algale mediante *S. capricornutum* (Tab. 4); inoltre gli effetti tossici con *D. magna* sono positivamente correlati con la concentrazione totale di IPA negli estratti organici.

**Tabella 4.** Coefficiente di Pearson ottenuto per le correlazioni statisticamente significative tra la concentrazione totale di IPA e/o tra il contributo percentuale al totale degli IPA a differenti anelli ed i risultati dei test ecotossicologici.\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

Suolo Tal Quale		Estratto Organico		Estratto Acquoso	
Relazione	$r_p$	Relazione	$r_p$	Relazione	$r_p$
Ostrac <sub>mort</sub> - IPA <sub>2 anelli</sub>	0.936**	<i>S. capricornutum</i> - IPA tot.	0.983***	<i>S. capricornutum</i> - IPA tot.	0.897**
Ostrac <sub>inib</sub> - IPA <sub>2 anelli</sub>	0.924**	Caso peggiore - IPA tot.	0.995***	Caso peggiore - IPA tot.	0.896**
<i>S. saccharatu</i> - IPA <sub>5 anelli</sub>	0.767*	<i>S. capricornutum</i> - IPA <sub>4 anelli</sub>	0.820*	<i>S. capricornutum</i> - IPA <sub>4 anelli</sub>	0.801*
		Caso peggiore - IPA <sub>4 anelli</sub>	0.793*	Caso peggiore - IPA <sub>4 anelli</sub>	0.800*
		<i>D. magna</i> - IPA tot.	0.988***		

#### Calcolo TBI ed applicazione classi di rischio ecotossicologico

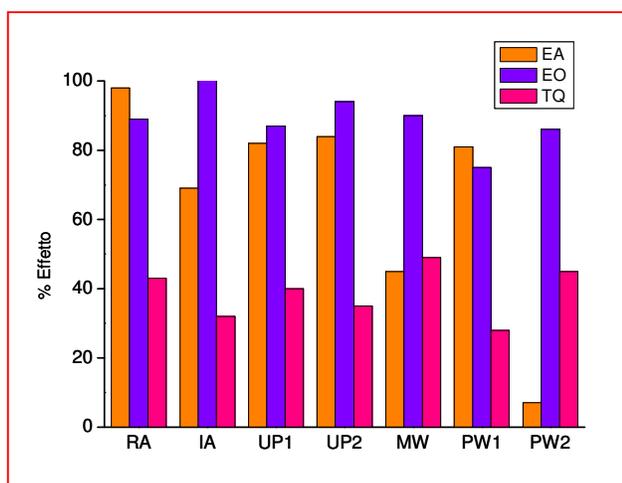
I valori di tossicità ottenuti con la procedura TBI, che ha elaborato le risposte dei singoli test endpoints espresse come percentuale di effetto massima per le tre matrici, sono compresi tra 8,5 calcolato per il sito UP1 ed il 31,6% calcolato per IA (Fig. 8).

La scala di rischio ecotossicologico colloca RA e UP2 nel livello di rischio alto, IA, MW e PW2 in quello intermedio, e PW1 e UP1 in quello basso (Fig. 8). Non è stata evidenziata alcuna correlazione tra i livelli di rischio ecotossicologico ed il contenuto totale di IPA nei suoli oggetto di studio. Tuttavia, da un punto di vista qualitativo possiamo osservare che per i siti UP2, MW e PW1 esiste una corrispondenza tra la classe del contenuto totale di IPA ed il livello di rischio ecotossicologico identificato.

Intervalli di concentrazione totale di IPA (ng g <sup>-1</sup> )	Sito	TBI %	Rischio Ecotossicologico
<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> <span>&gt;2000</span> <span>1000</span> <span>500</span> <span>200</span> <span>0</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> <span>2000</span> <span>1000</span> <span>500</span> <span>200</span> </div>			
	RA	23,7	Alto
	UP2	10,9	Alto
	IA	31,6	Medio
	MW	13,7	Medio
	PW2	12,7	Medio
	PW1	11,7	Basso
	UP1	8,5	Basso

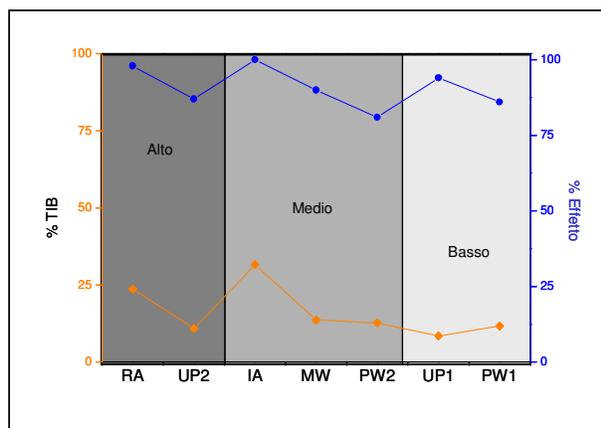
**Figura 8.** Intervalli di concentrazione totale di IPA, %TBI e classi di rischio ecotossicologico, per i siti oggetto di studio. Rischio alto: 20-50%, medio 5-20% con  $C > 0$ , basso 5-20% con  $C \leq 0$ , vedi anche Materiali e metodi.

Dal confronto dei valori di tossicità espressi come percentuale di effetto, identificati come casi peggiori nelle singole matrici per i siti oggetto di studio (Fig. 9), è possibile osservare che dei 4 casi (PW1, UP2, RA e UP1) in cui viene evidenziata una possibile contaminazione equivalente sia nell'estratto acquoso che organico (valori prossimi di percentuale di effetto per EA e EO), due sono siti collocati in classi di rischio (Fig. 8) elevate (RA e UP2) e due in quelle basse (PW1 e UP1).



**Figura 9.** Tossicità massima (%Effetto) fatta registrare dalle diverse matrici dei suoli oggetto di studio.

I valori di tossicità massima (% Effetto), ottenuti considerando tutti i risultati delle diverse matrici, per ciascun sito, sono raggruppati tra circa l'80% ed il 100% (Fig.10). Gli andamenti, tra i siti, della massima percentuale d'effetto e la percentuale del TBI sono simili, con picchi massimi evidenziati per il sito IA (Fig. 10).



**Figura 10.** Andamento della massima tossicità (% Effetto) identificata per ciascun sito, e %TBI. I siti sono ordinati per classi di rischio.

## Discussione

I suoli oggetto di studio hanno mostrato un ampio range di valori per i parametri chimici e fisici. I valori più elevati di contenuto d'acqua sono stati misurati nei siti più ricchi in sostanza organica, infatti il contenuto di sostanza organica condiziona fortemente il contenuto di acqua per la sua notevole capacità di trattenerla. In particolare, un elevato contenuto di sostanza organica è stato misurato nel sito UP1, questo potrebbe essere dovuto alla copertura di erba presente ed agli abbondanti inputs di lettiera. Anche la tessitura del suolo può influenzare il suo contenuto di acqua: in PW2 dove il suolo è risultato sabbioso e povero in sostanza organica è stato infatti misurato il più basso valore di contenuto di acqua.

L'elevato contributo percentuale di IPA a 4 e 5 anelli nei suoli oggetto di studio è attribuibile principalmente ad una loro maggiore deposizione atmosferica, piuttosto che al loro peso molecolare.

Gli IPA ad alto peso molecolare, legati alle polveri sottili originate durante la combustione, da cui desorbono molto lentamente, (Cousins *et al.*, 1999; Krauss *et al.*, 2000), tendono ad accumularsi nei suoli. Pertanto, la diminuzione della velocità di degradazione degli IPA con l'incremento di peso molecolare (Bossert and Bartha, 1986; Krauss *et al.*, 2000) tende a modificare la composizione percentuale degli IPA accumulati nei suoli.

### *Tossicità dei suoli indagati*

La più alta tossicità con il suolo tal quale è stata evidenziata per il sito remoto RA, dove è stata misurata la minore concentrazione di IPA, potrebbe essere dovuta alla elevata concentrazione di alcuni elementi

in traccia come Cr, V e Fe, presenti in questo suolo di origine vulcanica (Maisto *et al.*, 2006). La co-presenza di questi 2 tipi di sostanze chimiche ha spesso un effetto sinergico sulla contaminazione dei suoli, infatti, i metalli inibiscono molti enzimi batterici in grado di catabolizzare i composti aromatici (Gemmel *et al.*, 2000; Roane, 2001).

La elevata tossicità ottenuta per il sito IA, non solo per il suolo intero ma anche per gli estratti acquoso ed organico è attribuibile sia alla elevata concentrazione di IPA misurata sia alla presenza di elevate concentrazioni di altri contaminanti organici e di metalli come Fe, Al, Zn, Cr (Adamo *et al.*, 2002). Infatti, nel corso degli anni, l'accumulo di sottoprodotti generati dal ciclo produttivo all'interno dell'ex sito industriale, ha generato strati di riporto gravemente inquinati dello spessore di 3-5 metri.

Tutti gli organismi della batteria di test effettuata hanno evidenziato gli effetti tossici degli estratti organici dei suoli testati.

Tali effetti tossici potrebbero essere attribuiti alla contaminazione da IPA dei siti oggetto di studio, in accordo con la correlazione tra l'andamento spaziale della concentrazione totale di IPA ed il caso peggiore della batteria di test ecotossicologici effettuati. E' importante comunque sottolineare che, la tossicità degli estratti organici può essere potenziata dalla vigorosa estrazione in solventi organici che può portare ad una sovrastima della effettiva biodisponibilità dei contaminanti organici dei suoli (Alexander, 1995).

La tossicità misurata per gli estratti acquosi dei suoli, si è rivelata sempre più bassa di quella misurata in altre matrici, probabilmente a causa della scarsa presenza di contaminanti come IPA a basso peso molecolare solubili in acqua e/o contaminanti inorganici nei siti esaminati.

La tossicità complessiva della batteria di test applicata alle differenti matrici, espressa come caso peggiore ha fatto registrare i valori più elevati con gli estratti organici e quelli più bassi con il suolo tal quale in tutti i siti indagati tranne nell'area remota.

Resta tuttavia da chiarire se la minore tossicità che generalmente si osserva sul tal quale rispetto agli estratti acquoso ed organico, rispecchi effettivamente una minore disponibilità dei contaminanti in questione per gli organismi test considerati o una sovrastima di tali effetti legata al processo di estrazione che comunque non simula un processo naturale.

Nel sito RA, i valori più elevati sono stati ottenuti con la matrice tal quale rispetto a quelli misurati con gli estratti, in accordo con l'ipotesi di una azione sinergica nel suolo intero. Per il sito industriale IA la tossicità registrata con la matrice tal quale è risultata intermedia tra quella fatta registrare dall'estratto organico e quella dell'estratto acquoso, lasciando presupporre una interazione tra contaminanti e matrice che porta ad una mitigazione degli effetti.

#### *Comparazione tra matrici*

La concentrazione totale di IPA è risultata correlata con il caso peggiore delle batterie di test ecotossicologici condotti sia con l'estratto acquoso che con l'estratto organico ma non nel caso del suolo tal quale. Ciò conferma l'ipotesi che la matrice suolo potrebbe agire nascondendo e/o impedendo l'azione tossica dei contaminanti sull'attività biologica.

Gli effetti tossici ottenuti con gli estratti organici potrebbero essere attribuiti alla contaminazione da IPA dei siti, in accordo con la correlazione tra l'andamento spaziale della concentrazione totale di IPA ed il caso peggiore della batteria di test ecotossicologici effettuati.

La correlazione positiva misurata per gli estratti acquosi tra il caso peggiore e la concentrazione totale di IPA potrebbe essere indice di una contaminazione congiunta: Alfani *et al.* (2001) ha infatti evidenziato una correlazione significativa tra la concentrazione totale di IPA e quella di metalli pesanti nelle foglie di *Q. ilex* nell'area urbana di Napoli.

Il saggio di tossicità acuta con il batterio luminescente *V. fischeri* rappresenta l'unico test che è stato possibile condurre su tutte e tre le matrici per la disponibilità di metodi standardizzati e quindi permette di effettuare un confronto diretto della tossicità misurata. Pertanto, dall'analisi comparativa dei valori di tossicità ottenuti con il test acuto Microtox<sup>®</sup> è stato possibile ipotizzare il contributo dei diversi contaminanti alla tossicità complessiva dei suoli.

Nei siti RA e IA, la più alta tossicità misurata per il suolo tal quale potrebbe essere attribuita principalmente ad una contaminazione di tipo organico, e potenziata da altre sostanze chimiche fortemente legate alle particelle di suolo che quindi non hanno esercitato effetti tossici negli estratti acquosi.

Nei siti (MW, PW1, PW2) dove *V. fischeri* identifica i più alti effetti tossici nell'estratto organico piuttosto che nel suolo tal quale o nell'estratto acquoso è possibile ipotizzare che le particelle di suolo e le complesse interazioni esistenti nel suolo tal quale tendano a mitigare gli effetti dei contaminanti organici ed inorganici.

In tutti i siti oggetto di studio non sono stati rilevati effetti tossici per gli estratti acquosi con il test Microtox<sup>®</sup> tranne nel sito UP1: la contaminazione di tipo inorganico presumibilmente presente viene, anche in questo caso in qualche modo resa indisponibile nel suolo tal quale in cui una tossicità trascurabile è stata misurata. Non è

comunque da escludere anche una interazione negativa (antagonismo) tra contaminanti organici ed inorganici.

#### *Sensibilità dei test ecotossicologici*

I test di contatto rappresentano il punto di partenza per la valutazione dello stato ecotossicologico del suolo perchè comprendono gli effetti sugli organismi della mobilità dei contaminanti e della loro biodisponibilità. (Leitgib *et al.*, 2007), e gli effetti dovuti alla interazione tra contaminanti, matrici ed organismi test (Gruiz, 2005). Tuttavia i test di contatto risultano essere talvolta meno sensibili di quelli effettuati sugli estratti dei suoli e non sempre permettono la valutazione dell'EC<sub>50</sub>.

Anche se i test di contatto risultano sicuramente più rilevanti da un punto di vista ecologico, non sono sempre controllabili e gestibili da un punto di vista sperimentale. Per tale ragione molti test sul suolo tal quale riescono con fatica a completare il processo di standardizzazione (Van Gestel *et al.*, 1997).

Le differenti risposte degli organismi test sono quindi il risultato dell'interazione della sensibilità dei diversi organismi e di diversi livelli e tipi di contaminazione. Hamdi *et al.* (2006) hanno riportato il test con gli ostracodi come un test appropriato per valutare la tossicità dei suoli dovuta ai composti idrofobici. I test di fitotossicità con i semi ed in particolare quelli di allungamento radicale forniscono informazioni dirette ed indirette (water-mediated) degli effetti della contaminazione dei suoli da IPA (Linder *et al.*, 1990).

Sui suoli interi, il test con gli ostracodi ed il test di allungamento radicale con *S. saccharatum*, più che altri test effettuati sembrano sottolineare gli effetti tossici da IPA come evidenziato anche dalle correlazioni statistiche ottenute. Nel caso degli ostracodi la

correlazione ottenuta è tra effetti, sia a breve che a lungo termine, ed IPA a due anelli, più solubili e quindi più disponibili (il test con gli ostracodi prevede una interfaccia di tipo acquoso).

Il test Microtox<sup>®</sup> è ampiamente utilizzato per lo screening di contaminanti solubili in acqua (Weideborg *et al.*, 1997) e di alcuni contaminanti organici (Kaiser and Palabrica, 1991; Bispo *et al.*, 1999). In particolare le sue risposte sembrano essere correlate con la solubilità in acqua degli IPA (Loibner *et al.*, 2004).

Il test Microtox<sup>®</sup> rappresenta sempre il caso peggiore nella batteria di test condotta sui suoli tal quale e talvolta per gli estratti acquosi ed organici. E' presumibile che questo tipo di test acuto riesca ad identificare meglio degli altri test della batteria (organismi più complessi) gli effetti congiunti dei contaminanti, producendo sempre le risposte più elevate. Inoltre gli organismi test ed il meccanismo di azione dei contaminanti monitorato come endpoint rende il test particolarmente adatto alle valutazioni a breve termine.

Il fatto che il caso peggiore sia rappresentato sia dal saggio algale (40% dei casi ) sia dal test Microtox<sup>®</sup> (40%), conferma la idoneità delle alghe e dei batteri nell'identificare la contaminazione da IPA dei suoli (Bispo *et al.*, 1999; Baun *et al.*, 2002; El-Alawi *et al.*, 2002). In particolare *S. capricornutum* sembrerebbe particolarmente sensibile come evidenziato dalla correlazione con la concentrazione totale di IPA. Inoltre poiché si tratta di due test profondamente differenti soprattutto nel tempo di esposizione, è possibile pensare alla predominanza di azione di una categoria di IPA in particolare o di un altro contaminante organico. Tale ipotesi risulta confermata dalla correlazione tra IPA a 4 anelli e saggio algale.

*D. magna* si dimostra spesso un organismo poco sensibile agli IPA (Bispo *et al.*, 1999; Fernandez *et al.*, 2005).

Questo cladocero identifica la massima tossicità e quindi rappresenta il caso peggiore per gli estratti organici una sola volta e nel sito IA, ciò lascia ipotizzare una contaminazione di tipo organico non solo dovuta agli IPA ma anche ad altri contaminanti.

Il caso peggiore della batteria di test effettuati con gli estratti acquosi è rappresentato nel 70% dei casi dal saggio algale cronico, ciò lascia presupporre la presenza di sostanze chimiche che possono agire singolarmente o congiuntamente producendo principalmente effetti tossici a lungo termine. Anche una piccola frazione di IPA solubili a 4 anelli probabilmente contribuisce a tale tossicità come lascia presupporre la correlazione positiva ottenuta.

Tra tutti i test effettuati i test di fitotossicità condotti con l'alga verde *S. capricornutum* e con i semi di *L. sativum*, *S. saccharatum* e *S. alba* si sono rivelati come i più sensibili. Infatti, in tutte le matrici esaminate, il test di fitotossicità evidenzia sempre un apprezzabile effetto tossico, anche se non identifica sempre il caso peggiore.

La elevata sensibilità dei test di fitotossicità nei suoli interi e negli estratti è in accordo con i dati riportati da altri autori in letteratura (Keddy *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1986, Baun *et al.*, 2002). È importante sottolineare che il test di fitotossicità e la valutazione dell'accrescimento degli ostracodi sono gli unici test effettuati che evidenziano effetti a lungo termine.

Dall'analisi dei risultati ottenuti si rafforza la necessità di utilizzare una batteria di test con organismi appartenenti a differenti livelli di complessità biologica, diversi livelli trofici e di funzionalità ecologica a diversi gruppi tassonomici con diverse vie di esposizione (Van Straalen and Van Gestel, 1993; OECD 1987; 1989). La tossicità infatti si può considerare come "specie-specifica" e non è possibile prevedere in assoluto la risposta di un organismo test. Si è anche evidenziato la

necessità di valutare gli effetti sia a breve che a lungo termine perchè evidenziano caratteristiche peculiari dei contaminanti.

*Indice di tossicità e scala di rischio*

L'applicazione dell'indice di tossicità ha permesso di integrare tutti i risultati di tossicità ottenuti per le diverse matrici tenendo conto delle interazioni con le caratteristiche proprie della matrice, dei contaminanti e degli organismi utilizzati. I TBI calcolati hanno identificato il sito più tossico in IA seguito da RA, i valori ottenuti per i rimanenti siti si sono rivelati abbastanza simili tra loro e contenuti in un intervallo del 30%. Il TBI sembrerebbe quindi evidenziare la elevata contaminazione del sito industriale misurata in tutte le matrici testate, e la elevata tossicità del suolo RA dovuta presumibilmente ad una interazione tra contaminanti. In questi due casi esiste quindi una corrispondenza tra TBI ed il caso peggiore delle tre matrici. E' importante sottolineare inoltre che l'introduzione del giudizio esperto e del fattore di correzione statistico nella valutazione dei dati ecotossicologici può portare a dei risultati complessivamente più contenuti rispetto a quelli registrati dai casi peggiori delle batterie di test.

Per valutare la differenza tra la tossicità identificata come caso peggiore e come TBI è necessario tuttavia utilizzare i risultati di massima percentuale di effetto tossico delle batterie di test effettuate, in quanto tali dati sono stati utilizzati per il calcolo del TBI. La massima percentuale di effetto ottenuta dalle batterie di test condotte sulle tre matrici può rappresentare la tossicità complessiva del sito espressa come caso peggiore. Anche in questo caso per IA e RA esiste una corrispondenza con il TBI.

I valori misurati per gli altri siti sono abbastanza vicini tra loro e tutti i dati sono comunque compresi nell' intervallo tra l'80 ed il 100% di effetto. Usando questo criterio di caso peggiore (%effetto), quindi non si riesce a discriminare tra livelli di tossicità sicuramente differenti tra i siti: l'utilizzo del caso peggiore porta ad un appiattimento della tossicità verso valori elevati generando una valutazione troppo conservativa. L'introduzione dell'indice di tossicità non riesce comunque a generare una netta differenziazione tra i siti.

Ciò potrebbe essere dovuto a vari fattori tra cui l'utilizzo della risposta tossica (in % effetto) alla matrice non diluita (100%) per il calcolo del TBI. Questo è stato necessario per permettere l'utilizzo di tutti i risultati dei test condotti sul suolo intero che non prevedevano diluizioni.

L'introduzione della scala di rischio tiene conto tra l'altro della coerenza tra i risultati (Consistenza). La consistenza esprime il grado di accordo tra i vari endpoints: è alta se tutti i test concordano, ed è quindi alta anche la fiducia di poter identificare una situazione di rischio; la consistenza però diminuisce se i risultati sono contraddittori o conflittuali, e quindi diminuisce anche la fiducia di identificare correttamente il grado di rischio. La tossicità dei siti viene ad essere risolta in tre livelli di rischio ecotossicologico abbastanza differenti tra loro, con il livello più elevato per il sito RA, ed un livello medio per IA, anche se i TBI collocherebbero i due siti nello stello livello.

La comparazione delle massime tossicità ottenute per ciascuna matrice (casi peggiori) espresse come % effetto, in ciascun sito, e del rischio ecotossicologico calcolato (che utilizza le tossicità espressa come % effetto) evidenzia che ad una tossicità degli estratti elevata e comparabile (IA, RA) corrisponde una classe di rischio alta, e quindi la classe di rischio indica la presenza di contaminazione di tipo sia

organico che inorganico anche se non disponibile nella matrice tal quale. Nei casi (PW1 e UP1) con tossicità degli estratti più ridotte ma comunque comparabili il rischio si colloca invece nel livello più basso e sembrerebbe rappresentare una probabile azione di tipo antagonista tra i contaminanti. Per i siti in cui si registra una tossicità in prevalenza di un estratto si ottiene un livello di rischio intermedio. Per quanto riguarda la tossicità della matrice suolo tal quale, non sembra esserci una relazione con il rischio calcolato.

La batteria di test selezionata nell'esecuzione dello studio in oggetto potrebbe essere la ragione della mancanza di correlazione tra concentrazione totale di IPA e TBI. Anche se, esiste un andamento confrontabile in particolare nei siti UP2 MW e PW1. La batteria selezionata potrebbe essere inappropriata o semplicemente incompleta.

Risulta quindi basilare una selezione opportuna dei test da utilizzare, con particolare attenzione a quelli cui si attribuisce maggiore peso nell'indice (test sul tal quale). Inoltre sarebbe necessario l'utilizzo di test con matrice solida che prevedano una diluizione e quindi permettano il calcolo dell' $EC_{50}$  o comunque di un  $EC_X$ .

I test di fitotossicità che si sono rivelati i test più sensibili indipendentemente dalla matrice testata ed hanno quindi sicuramente contribuito alla definizione del rischio, devono essere sicuramente inclusi in una batteria di test di tossicità idonea per la valutazione del rischio ecotossicologico da IPA.

L'indice di rischio ecotossicologico utilizzato per definire la tossicità dei suoli oggetto di studio anche se necessita di modifiche ed integrazioni per permetterne una applicazione idonea, rappresenta sicuramente un passo in avanti nella valutazione integrata della tossicità delle complesse matrici che i suoli rappresentano.

## Conclusioni

I risultati del lavoro di ricerca effettuato sottolineano l'importanza dei test ecotossicologici a complemento della analisi chimica dei contaminanti presenti: essi evidenziano gli effetti di ogni matrice del suolo su organismi appartenenti a differenti livelli trofici, ed inoltre permettono di valutare le risposte nel tempo degli organismi.

Tra tutti i test ecotossicologici condotti i test di fitotossicità si sono rivelati i più sensibili in tutte le matrici dei suoli testati, anche se questi non hanno identificato sempre il caso peggiore.

Gli effetti della contaminazione da IPA non sono del tutto evidenziabili nei test ecotossicologici condotti sul suolo tal quale, probabilmente a causa delle interazioni presenti nel suolo intero; diversamente i test condotti con gli estratti organico ed acquoso sembrano mostrare tale contaminazione.

L'indice TBI si è rivelato uno strumento utile per la comparazione della tossicità di suoli differenti perchè esso integra in un unico valore dati provenienti da molti test di tossicità condotti con differenti organismi test su differenti matrici tenendo in considerazione anche il "giudizio esperto".

Studi ulteriori porteranno alla scelta dei test e degli organismi idonei da includere nella batteria per consentire una migliore definizione del TBI.

## Bibliografia

- Aarts J.M.M.J.G., Denson M.S., Cox M.A., Schalk M.A.C., Garrison P. M., Tullis K., de Maan L.H.J., Brouwnew A., 1995. Species-specific antagonism of Ah receptor action by 2,2',5,5'-tetrachloro and 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology* 293:463-474.
- Adamo P., Arienzo M., Bianco M.R., Terribile F., Violante P., 2002. Heavy metal contamination of the soils used for stocking raw materials in the former ILVA iron-steel industrial plant of Bagnoli (southern Italy). *Science of Total Environment* 295: 17-34.
- Ahlf W., Heise S., 2005. Sediment Toxicity Assessment. Rationale for effect classes. *Journal of Soils and Sediments* 5: 16-20.
- Ahn Y., Sanseverino J., Gary S., 1999. Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation* 10:149-157.
- Alexander M., 1995. How toxic are toxic-chemicals in soil. *Environmental. Science and Technology*. 29: 2713-2717.
- Alfani A., Maisto G., Prati M.V., Baldantoni D., 2001. Leaves of *Quercus ilex* L. as biomonitors of PAH in the air of Naples (Italy). *Atmospheric. Environment* 35: 3553-3559.
- ANPA, 2000. Indicatori ed indici ecotossicologici e biologici applicati al suolo. RTI CTN-SSC 3/2000
- APAT, 2001. Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota. RTI CTN-AIM 4/2001.

- APAT, 2004. Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati: utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. RTI CTN-TES 1/2004.
- APHA-AWWA-WEF, 1982. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18<sup>th</sup> d.
- ARPAT, 1998. Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico. Quaderni Ricerca e Formazione n. 8.
- ASTM, 1994. Standard Practice for conducting Early Seegling Growth tests. American Society for Testing and Materials E 1598-94.
- Baker A.J.M. and Walker P.L., 1989. Review: physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability* 1:7.
- Baun A., Justesen K.B., Nyholm N., 2002. Algal tests with soil suspensions and elutriates: A comparative evaluation for PAH-contaminated soils. *Chemosphere* 46, 251-258.
- Bernardi R., 1991. L'allevamento di *Daphnia magna*, In IRSA: Saggio di tossicità con *Daphnia*. Quaderni 93:3.1-3.18.
- Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M., 1997. Les apports des tests d'écotoxicité á l'analyse d'une terre contaminée. *Analisis* 25, M66-M69.
- Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M., 1999. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Organic Geochemistry*. 30: 947-952.
- Bjorseth A., Becher G., 1986. PAH in work atmospheres: occurrence and determination. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Boero V., 1989. Influenza del clima sulla frazione argillosa della terra rossa. Atti del VII convegno Nazionale S.I.C.A, Fertilità del terreno e biomassa microbica.

- Bombardier M. and Bermingham N., 1999. The SED-TOX index: Toxicity – directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard. Concept and application. *Environmental Toxicology Chemistry* 18: 685-698.
- Bossert I.D. and Bartha R., 1986. Structure - biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *B. Environmental Contamination and Toxicology* 37: 490-495.
- Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A., 1998. *Ecologia generale*. UTET 1998.
- Calamari D., 1993. *Chemical exposure predictions*, Lewis Publishers.
- Chial B., Persoone G., 2002. Cyst-Based Toxicity Tests XIII— Development of a Short Chronic Sediment Toxicity Test with the Ostracod Crustacean *Heterocypris incongruens*: Methodology and Precision. *Environmental Toxicology* 17:528-532.
- Costan G., Bermingham N., Blaise, C., Ferard J.F., 1993. Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environmental Toxicology and Water* 8: 115-140.
- Cousins I.T., Gevao B., Jones K.C., 1999. Measuring and modelling the vertical distribution of semi-volatile organic compounds in soils. I: PCB and PAH soil core data. *Chemosphere* 39: 2507-2518.
- D'Avino L., 2002. Esposizione del metodo di V. Parisi per la valutazione della Qualità Biologica del Suolo (QBS) e proposta di standardizzazione delle procedure. Museo di Storia Naturale dell'Università di Parma.
- Daphtoxkit F<sup>TM</sup> magna. Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard operational procedure :1-16.
- Della Croce N., Cattaneo Vietti R., Danovaro R. 1997. *Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero*. UTET.

- El-Alawi Y.S., McConkey B.J., Dixon D.G., Greenberg B.M., 2002. Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 12-21.
- Environment Canada, 1993. Evaluation of the PEEP index and recommended toxicity tests for the Fraser River Basin. DOE FRAP 1993-09: 59 pp.
- EPA, 1978. The *Selenastrum capricornutum* PRINTS Algal assay bottle test: experimental design, application, and data interpretation protocol. EPA-600/9-78-018.
- EPA, 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Cincinnati, Ohio: Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, 1985. EPA/600/4-85/013.
- EPA, 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 03-93, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minnesota.
- EPA, 1996. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA/712/C-96/154.
- Fent K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicological Letters* 140: 353-365.
- Fernandez M.D., Cacigal, E., Vega M.M., Urzelai A., Babin M., Pro J., Tarazona J.V., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 62:174-184.

- Gabos G., Ikononou S., Schopflocher R., Fowler, White, Prepas, Prince and Chen, 2001. Characteristics of PAHs, PCDD/Fs and PCBs in sediment following forest fires in northern Alberta. *Chemosphere* 43: 709-719.
- Garon D., Krivobok S., Wouessidjewe D., Seigle-Murandi F., 2002 Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorine *Chemosphere* 47: 303–309
- Gemmel R.T., C.J. Knowles, 2000. Utilization of aliphatic compounds by acidophilic eterotrophic bacteria. The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic compounds and heavy metals. *FEMS Microbiology Letters* 192:185-190.
- Gorden R.W., Hazen T.C., Fliermans C.B., 1993. Rapid screening for bacteria capable of degrading toxic organic compounds. *Journal of Microbiological Methods* 18:339-347.
- Gruiz K., 2005. Soil Testing Triad and Interactive Ecotoxicity Tests For Contaminated Soil. In: Fava, F., Canepa, P. (Eds.). *Soil Remediation Series no. 6*. INCA, Venice, Italy, pp. 45-70.
- Guilherme R., Lotufo 1998. Lethal and sublethal toxicity of sediment associated fluoranthrene to benthic copepods: application of the critical body residue approach. *Aquatic Toxicology* 44:17-30.
- Hamdi H., Manusadžianas L., Aoyama, I., Jedidi, N., 2006. Effects of anthracene, pyrene and benzo[*a*]pyrene spiking and sewage sludge compost amendment on soil ecotoxicity during a bioremediation process. *Chemosphere* 65:1153-1162.
- Hartwell SI., 1997. Demonstration of a toxicological risk ranking method to correlate measures of ambient toxicity and fish community diversity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 361-371.

- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1983. Polynuclear aromatic hydrocarbons part I: chemical, environmental and experimental data. Working group on the evaluation of the carcinogenic Risk of Chemical to Humans. IARC, Vol.32, Lyon, France.
- IRSA, 1991. Saggio di tossicità con DAPHNIA. Quaderni IRSA-CNR, 93.
- ISO, 1998. Water quality - determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Standard 11348. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133: 71-84.
- Joubert G., 1983. Detailed method for quantitative toxicity measurements using the green algae *Selenastrum capricornutum*. *Aquatic Toxicology* 13:467-485.
- Juhasz A.L., 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia* *Journal of Applied Microbiology* 83:189-198.
- Kaiser K.L.E. and Palabrica V.S., 1991. *Photobacterium phosphoreum* Toxicity Data Index. *Water Quality. Research Journal Canada* 26: 361-431.
- Keddy P.A., Ellis, T.H., 1985. Seedling recruitment of 11 wetland plant-species along a water level gradient - Shared or distinct responses. *Canadian Journal of Botany* 63: 1876-1879.
- Krauss M., Wilcke W., Zech W., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in forest soils: depth distribution as indicator of different fate. *Environmental Pollution*. 110: 79-88.

- Leitgib L., Kálmán J., Gruiz K., 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere* 66: 428-434.
- Linder G., Greene J.C., Ratsch H., Nwosu J., Smith S., Wiborn D., 1990. Seed germination and root elongation toxicity tests in hazardous waste site evaluation. In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Lower, W.R. (Eds.). *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume (ASTM STP 1091)*. ASTM, Philadelphia, pp. 177-187.
- Loibner A.P., Szolar O.H.J., Braun R., Hirmann D., 2004. Toxicity testing of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons using Lumistox<sup>®</sup>. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 557-564.
- Mac Kay D., 1991. *Handbook of Ecotoxicology*, vol.2. Blackwell Scientific Publications.
- Maffiotti A., Bona F., Volterra L., 1997. *Introduzione all'ecotossicologia. Analisi e recupero dei sedimenti marini. Quaderni di Tecniche di Protezione Ambientale*. Pitagora, Bologna Ed.
- Maisto G., De Nicola F., Iovieno P., Prati M.V., Alfani A., 2006. PAHs and trace elements in volcanic urban and natural soils. *Geoderma* 136: 20-27.
- Marchetti R., Vigano I., 1991. Metodi per la determinazione di effetti tossici acuti con *Daphnia magna*. In *IRSA: Saggi di tossicità con Daphnia*. Quaderni 93:2.1-2.23.
- McCarthy F., Shugart L.R., 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Pub., Chelsea USA.
- Molnár M., Leitgib L., Gruiz K., Fenyvesi É., Szaniszló N., Szejtli, J., Fava F., 2005. Enhanced biodegradation of transformer oil in soils

- with cyclodextrin – from the laboratory to the field. *Biodegradation* 16, 159-168.
- Northern Contaminants Program (NCP), 1997. Canadian Arctic Contaminants Assessment Report, Department of Indian Affairs and Northern Development, Ottawa.
- OECD, 1984. Terrestrial plants: growth test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 208, Paris, France
- OECD, 1987. Report of the workshop on practical approaches to the assessment on the environmental exposure. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD, 1989. Report for the OECD Workshop on ecological effects assessment. Organization for Economic Co-operation and Development. Environmental Monographs N° 26.
- OECD, 2004. *Daphnia* sp. Acute Immobilization Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 202, Paris, France.
- Perin G., 2004. I test biologici nei sedimenti d'acqua dolce, analisi del rischio ecologico: dal dato chimico alla valutazione dell'effetto biologico. Alessandria 20-22 Dicembre 2004.
- Phillips B.M., Hunt J.W., Anderson B.S., Puckett H.M., Fairey R., Wilson C.J. and Tjeerdema R., 2001. Statistical significance of sediment toxicity test results: threshold values derived by the detectable significance approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 371-373.
- Rampa P., Ocelli C., Ferraro M., Gaffodio A., Fascina E., Radium P., 2000. Test di inibizione della crescita algale su matrici acquose: metodo miniaturizzato. Atti del Convegno Nazionale di Ecotossicologia. Torino 2000.

- Roane T.M., 2001. Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of co-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3208-3215.
- Robidoux P.Y., Gong P., Sarrazin M., Bardai G., Paquet L., Hawari J., Dubois C., Sunahara G.I., 2004. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 300-313.
- Sbrilli G., Liberti A., Caldini G., Corsini A., 1998. Metodologia di saggio algale per il controllori corpi idrici e delle acque di scarico, ARPAT :121.
- Sbrilli G., 2000. Il Test le alghe *Raphidocelis subcapitata*, *Dunaliella tertiolecta*. ARPAT, corso di ecotossicologia applicata, Milano 19-20 ottobre 2000.
- Sprague J.B., Ramsay B.A., 1965. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 22:425-432.
- Steinberg S.M., Poziomek E.J., Engelman W.H., Rogers K.R, 1995. A review of environmental application of bioluminescence measurement. *Chemosphere* 30: 11:2155-2197.
- Stronkhorst J., Schot M.E., Dubbeldam M.C., Ho K.T., 2003. A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Marine Pollution Bulletin* 46: 56-64.
- Thomas J.M., Skalski J.R., Cline J.F., McShane M.C., Simpson J.C., Miller W.E., Peterson S.A., Callahan C.A., Greene J.C., 1986. Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5: 487-501.

- Tsui M.T.K. and Chu L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52: 1189-1197.
- US-EPA, 1991. Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal, n. 503/8-91/001.
- Van Gestel C.A.M., Van Brummelen T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5:217-225.
- Van Gestel C.A.M., Leon C.D. and Van Straalen N.M., 1997. Evaluation of soil fauna ecotoxicity tests regarding their use in risk assessment. In *Soil ecotoxicology*. Ed. Tarradellas J., Bitton G., Rossel D. CRC Press Chap. 11 pp.291-314.
- Van Straalen N.M. and Van Gestel, C.A.M., 1993. Ecotoxicological test methods using terrestrial arthropods, Reports NoD93002, Department of Ecology and Ecotoxicology, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Vindimian R., Garric J., Flammarion P., Thybaud E., Babuts M., 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2386-2391.
- Weber C.I., 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organism. EPA/600/4-90/0271.
- Weideborg M., Vik E.A., Øfjord G.D., Kjønne O., 1997. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris Commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 384-389.

Weissenfels W.D., Klewer, H.J., Langhoff J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic-hydrocarbons (PAHs) by soil particles - Influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36, 689-696.