



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

**Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata XXII ciclo
Curriculum in Ecologia**

*“Sviluppo ed applicazione di una batteria di test ecotossicologici
idonea alla valutazione della tossicità di suoli”*

Coordinatore: Prof. Ezio Ricca

Candidata: Dott. ssa Rita Carotenuto

Tutore: Dott. ssa Giulia Maisto

Tutore esterno: Dott. ssa Sonia Manzo

A.A. 2008-2009

INDICE

1. Introduzione	4
1.1 Il suolo	4
Formazione di un suolo	4
Proprietà del suolo	5
Componente biotica del suolo	8
1.2 Qualità del suolo e contaminazione	10
Metalli pesanti	11
1.3 L'ecotossicologia	13
Test di tossicità	15
1.4 Valutazione della tossicità dei suoli	17
Saggi ecotossicologici sulla matrice suolo tal quale	18
Saggi ecotossicologici sull' estratto acquoso del suolo	19
2. Scopo della ricerca	22
3. Materiali e metodi	24
3.1 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con <i>Daphnia magna</i>	24
3.2 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con <i>Selenastrum capricornutum</i>	27
3.3 Campionamento	31
3.4 Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli	32
3.4.1 pH	32
3.4.2 Capacità idrica massimale (CIM)	32
3.4.3 Tenore idrico (TI)	
2932	
3.4.4 Sostanza organica (SO)	33
3.4.5 Contenuto di carbonio e azoto	33
3.4.6 Tessitura	33
3.4.7 Contenuto totale dei metalli	33
3.4.8 Contenuto dei metalli nella frazione disponibile	34
3.4.9 Contenuto dei metalli nell'estratto acquoso del suolo	35
3.5 Analisi ecotossicologiche e selezione della batteria	35
3.5.1 Saggi di tossicità sul suolo	36

3.5.2 Test acuto in fase solida con il batterio <i>V. fischeri</i>	36
3.5.3 Test acuto e cronico di fitotossicità con <i>Sorghum saccharatum</i> , <i>Lepidium sativum</i> e <i>Sinapis alba</i>	37
3.5.4 Test acuto e cronico con l'ostracode <i>Heterocypris incongruens</i>	38
3.5.5 Test acuto e cronico con il lombrico <i>Eisenia veneta</i>	39
3.5.6 Saggi di tossicità sull'estratto acquoso del suolo	40
3.5.7 Test acuto con il batterio <i>V. fischeri</i>	40
3.5.8 Test cronico con l'alga unicellulare <i>S. capricornutum</i>	41
3.5.9 Test acuto con il cladocero <i>Daphnia magna</i>	42
3.6 Espressione dei risultati di tossicità	43
3.7 Calcolo di un indice di tossicità integrato	43
3.8 Analisi statistica	45
4. Risultati e discussione	46
4.1 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con <i>D. magna</i>	46
4.1.1 Risultato della messa a punto del saggio cronico su suolo con <i>D. magna</i>	54
4.2 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con <i>S. capricornutum</i>	56
4.2.1 Risultato della messa a punto del saggio cronico su suolo con <i>S. capricornutum</i>	61
4.3. Valutazione ecotossicologica dei suoli oggetto di studio	63
4.3.1 Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli	63
Metalli	65
Relazioni tra le caratteristiche dei suoli e i metalli	69
4.3.2 Risultati della batteria di test ecotossicologici su suolo	70
<i>V. fischeri</i>	70
<i>S. capricornutum</i>	71
Piante	72
<i>H. incongruens</i>	75
<i>E. veneta</i>	77
4.3.3 Risultati della batteria di test ecotossicologici su estratto acquoso del suolo	78
<i>V. fischeri</i>	78

<i>S. capricornutum</i>	79
<i>D. magna</i>	80
4.3.4 Correlazioni tra i livelli dei metalli e i risultati di tossicità	81
4.3.5 Indice di tossicità integrato (Toxicity test Battery integrated Index - TBI)	83
Relazioni tra TBI e metalli	87
5. Conclusioni	88
Bibliografia	90

1. INTRODUZIONE

1.1 Il suolo

Il suolo è lo strato superficiale che ricopre la crosta terrestre, esso deriva dalla alterazione di un substrato roccioso, chiamato roccia madre, per azione chimica, fisica e biologica. Il suolo è una matrice complessa poiché è caratterizzato da una parte solida (componente organica e componente minerale), una parte liquida e da una parte gassosa.

Lungo il profilo del suolo si possono distinguere diversi orizzonti litologici secondo il tasso di degradazione della roccia e le differenti caratteristiche chimiche e fisiche degli strati. Lo strato più superficiale prende il nome di orizzonte superiore ed è sovrastato talvolta dalla lettiera indecomposta. L'orizzonte immediatamente sottostante è invece caratterizzato da sostanza organica in via di decomposizione. Nello strato inferiore si trova l'orizzonte di eluviazione dove avviene il processo di percolazione delle acque meteoriche e di una parte delle particelle minerali fini, mentre l'orizzonte di illuviazione è quello dove le suddette particelle fini (argillose) si sono accumulate. Gli ultimi strati sono rappresentati da roccia alterata e infine dalla roccia madre.

Formazione di un suolo

Un suolo si origina dall'alterazione, per via fisica, chimica e biologica di un substrato pedogenetico, vale a dire un accumulo di materiale disgregato e in consolidato derivante da alterazione della roccia affiorante. Il percorso di formazione di un suolo varia moltissimo in funzione dell'ambiente in cui si sviluppa, le cui caratteristiche dipendono dall'intensità dei fattori pedogenetici: il clima, la topografia, la componente biotica, la roccia madre, il tempo.

La degradazione meteorica delle rocce rappresenta il fattore principale del primo stadio di formazione di un suolo: essa raggruppa tutti i processi di degradazione chimico-fisica cui sono soggette normalmente le rocce di affioramento e che variano al variare del clima e della composizione della roccia stessa. In particolare processi di alterazione fisica prevalgono in regioni dal clima arido mentre quelli di alterazione chimica dominano soprattutto nelle regioni umide. La temperatura gioca un ruolo

fondamentale nei processi di alterazione fisica attraverso i fenomeni di termoclastisimo e di crioclastisimo, quest'ultimo più accentuato nelle rocce argillose per la loro facilità ad assorbire e trattenere acqua.

Anche l'attività biologica contribuisce alla disgregazione della roccia, soprattutto attraverso quegli organismi detti "pionieri", che a loro volta costituiscono biomassa degradabile da altri tipi di microrganismi. Gli organismi pionieri per eccellenza sono i licheni, formati per simbiosi di un'alga e di un fungo. L'alga, mediante la fotosintesi, fornisce le necessarie fonti di carbonio al fungo che viceversa è in grado di fornire gli elementi nutritivi minerali necessari all'alga. I licheni quindi riescono a degradare la roccia crescendo molto lentamente e sviluppandosi all'interno di tessuti gelatinosi che permettono loro di sopravvivere anche a lunghi periodi di siccità.

L'attività biologica, oltre che accelerare la degradazione fisica, svolge un ruolo di fondamentale importanza in quanto assicura la mineralizzazione della sostanza organica rendendola disponibile alla riutilizzazione da parte degli organismi autotrofi.

La formazione di un suolo, quindi, risulta essere un processo lungo in cui effetti fisici si intrecciano all'attività biologica fino a formare un sistema in cui si realizzano equilibri estremamente complessi.

Proprietà del suolo

La conoscenza delle principali proprietà fisiche e chimiche dei suoli è fondamentale perché permette di prevedere i possibili percorsi di sostanze inquinanti ed inoltre consente di comprendere eventuali interazioni di queste ultime con il suolo.

La *struttura* di un suolo indica le modalità con cui le singole particelle si uniscono a formare aggregati mantenuti insieme da sostanze dette cementi e separati fra loro da superfici di rottura. La struttura generalmente varia da orizzonte a orizzonte nello stesso profilo di suolo, può essere di tipo lamellare, prismatica, granulare, incoerente. Questo fattore può influenzare la porosità e la permeabilità, la crescita delle radici delle piante, la lisciviazione e la resistenza dei suoli all'erosione.

La *tessitura*, invece, è data dalla proporzione esistente fra le classi diametriche in cui possono essere divise le particelle di suolo, ovvero il rapporto tra quantità di argilla, limo e sabbia. Il termine tessitura si applica alla frazione fine del suolo, cioè all'insieme di tutte le particelle di diametro inferiore ai 2 millimetri, oltre questa misura, si parla di scheletro. Le particelle sabbiose hanno un diametro compreso tra 2

e 0,05 mm, quelle limose tra 0,05 e 0,02 mm ed infine l'argilla composta da particelle inferiori a 0,002 mm (classificazione USDA, Dipartimento Agricoltura degli Stati Uniti). Quando predomina la sabbia i suoli sono ben areati e dotati di buon drenaggi, molto scarsa risulta invece la loro capacità di trattenere l'acqua e gli elementi nutritivi. I suoli dove predomina l'argilla, al contrario, sono caratterizzati da scarsa aerazione e difficile drenaggio, diventano plastici in presenza di acqua e tendono a essere duri e compatti allo stato secco. I suoli limosi presentano caratteristiche abbastanza simili a quelli argillosi, ma non riescono a formare complessi con la sostanza organica. D'altra parte questi suoli hanno capacità di scambio cationico leggermente più elevata dei suoli sabbiosi e, pertanto, una maggiore disponibilità di elementi nutritivi.

La tessitura di un suolo, insieme al suo stato di aggregazione, influenza direttamente la *porosità*, che esprime il volume degli spazi vuoti del suolo come rapporto percentuale sul volume totale. La *permeabilità* di un suolo è dipendente dal volume degli spazi interstiziali comunicanti tra loro (porosità effettiva) e viene espressa dalla quantità di fluido che attraversa il suolo. Suoli scarsamente permeabili possono saturarsi facilmente e provocare anossia riducendo l'attività biologica.

L'*acqua* contenuta nel suolo vi si trova in varie forme diversamente disponibili per gli organismi. L'acqua libera, cioè esclusa quella di cristallizzazione che è legata alla struttura dei cristalli, può essere trattenuta dal suolo con forze di intensità variabile. Essa si distingue in quattro categorie principali:

- 1) acqua igroscopica: forma un sottile strato intorno alle particelle del suolo; è trattenuta da forze di adesione particolarmente efficaci e non può perciò essere utilizzata da piante e da animali;
- 2) acqua capillare non assorbibile: occupa i pori capillari con diametro inferiore a 0,2 μm ; è trattenuta da una forza eccessiva rispetto alla capacità di suzione delle radici delle piante e non è quindi disponibile;
- 3) acqua capillare assorbibile: contenuta nei pori capillari con diametro superiore a 0,2 μm e inferiore a 8 μm ; le forze di adesione sono maggiori della forza di gravità ma possono essere vinte dalla pianta che riesce ad assorbire l'acqua;
- 4) acqua gravitativa: situata in pori di dimensioni superiori agli 8 μm ; essa scola per gravità ed è utilizzabile dalla vegetazione.

La *capacità di campo* di un suolo è data dalla quantità di acqua che può essere trattenuta da un suolo liberamente drenato, considerando il contenuto idrico relativo

a una tensione di 0,05 atmosfere. Le particelle colloidali delle frazioni argillose e limose trattengono più fortemente l'acqua, mentre i suoli sabbiosi presentano una minore capacità di ritenzione idrica.

La densità esprime la massa del terreno riferita all'unità di volume. Si distinguono la densità reale, che prende in considerazione solo il volume della frazione solida, e la densità apparente, che prende in considerazione il volume totale del terreno, compresi quindi gli spazi vuoti.

L'*adesione* è la forza con cui le particelle terrose sono legate da corpi estranei che vengono a contatto con il suolo, mentre la coesione è quella forza con cui le particelle terrose sono legate fra loro e si oppongono al distacco.

Tra le proprietà chimiche che caratterizzano un suolo è di notevole importanza il *pH* perché influenza processi fisici, chimici e biologici. Dal pH dipendono la solubilità degli elementi nutritivi e l'attività dei microrganismi responsabili della decomposizione della sostanza organica e della maggior parte delle trasformazioni chimiche che avvengono nel suolo. Questo parametro può influenzare la mobilità di varie sostanze, come ad esempio i metalli pesanti, poiché ne controlla la solubilità.

Anche la *salinità* del suolo fornisce indicazioni sulla presenza di elementi in soluzione. Livelli di salinità molto bassi sono in genere quelli molto sciolti e facilmente dilavabili, poveri della componente colloidale sia minerale che organica, nei quali è scarsa la presenza di elementi in soluzione.

La *capacità di scambio ionico* è quel fenomeno di interazione elettrostatica tra siti presenti nella matrice suolo e ioni facenti parte del terreno ed è una caratteristica legata alla presenza della componente colloidale, sia minerale che organica.

Le argille e l'humus sono particelle colloidali aventi un'area superficiale con cariche prevalentemente elettronegative nel caso delle particelle argillose, mentre i colloidali organici possono presentare alla loro superficie sia cariche negative che positive.

Le cariche negative sono solitamente neutralizzate da ioni positivi (cationi) trattenuti elettrostaticamente sulla superficie dei colloidali del terreno. Pertanto quanto più estesa è la superficie colloidale, tanto maggiore sarà la capacità di adsorbimento degli ioni da parte del suolo.

Gli ioni adsorbiti sono in equilibrio dinamico con quelli presenti in soluzione e possono essere scambiati con questi ultimi diventando disponibili per le piante.

I principali ioni implicati nello scambio cationico sono: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , e H^+ .

La *componente organica* del suolo include organismi viventi, loro parti e loro prodotti, totalmente o parzialmente decomposti. La frazione organica decomposta comprende sostanze umiche e non umiche. La frazione organica del suolo è costantemente soggetta a trasformazioni fisiche e chimiche che sono il risultato di processi di decomposizione e di mineralizzazione. Risultato finale di tali processi è la produzione di CO₂, acqua, nutrienti, acidi organici e inorganici. Biologicamente la sostanza organica è la fonte di cibo e di energia per i microrganismi, alcuni dei quali sono artefici di molte reazioni biochimiche del suolo (ammonificazione, nitrificazione, azoto-fissazione, ciclo dei nutrienti). La componente organica del suolo influisce positivamente sulla stabilità degli aggregati strutturali, migliorando la permeabilità nei suoli tendenzialmente più compatti e la capacità di ritenzione idrica nei suoli tendenzialmente più sciolti. Inoltre la sostanza organica migliora la capacità di scambio cationico aumentando i siti negativi in grado di adsorbire i gli elementi nutritivi in forma cationica e favorisce l'assimilabilità di anioni come fosforo e boro. Altri effetti positivi legati alla sua azione chelante, riguardano la disponibilità di alcuni micronutrienti come ferro, rame, zinco, manganese.

Componente biotica del suolo

Il suolo ospita una comunità biologica varia e complessa probabilmente a causa della sua eterogeneità fisica e chimica estremamente elevata a piccole scale, delle caratteristiche microclimatiche, e della fenologia degli organismi che promuovono lo sviluppo e il mantenimento di un elevato numero di nicchie (Tiedje *et al.*, 2001; Ettema e Wardle, 2002). Gli organismi del suolo sono stati classificati sulla base delle loro dimensioni in microflora (1-100 µm, batteri, funghi), microfauna (5-120 µm, protozoi, nematodi), mesofauna (80 µm-2 mm, collemboli, acari), macrofauna (500 µm-50 mm, lombrichi, termiti) e megafauna (> 20mm, insetti, lombrichi, molluschi) (Barrios, 2007).

La macrofauna e la megafauna compiono un intenso rimescolamento degli orizzonti (bioturbazione): esse sono in grado di prelevare parti di lettiera e miscelarle con materiale minerale proveniente da strati più profondi. Anche la mesofauna compie un'attività di rimescolamento, ma viste le ridotte dimensioni degli individui, la loro azione è modesta e concentrata negli strati superficiali.

La macrofauna, inoltre, ha un ruolo rilevante nella formazione di gallerie, che contribuiscono all'aerazione e alla regolazione del regime idrico del suolo, ringiovanendo il suolo e favorendo la sua evoluzione.

Tutta la pedofauna svolge un'intensa attività di frammentazione della lettiera, che favorisce la decomposizione della sostanza organica, poiché aumenta la superficie di attacco da parte della microflora.

Infine gli animali del suolo producono forme di aggregati molto stabili che derivano da escrementi, dati dal mescolamento di materiale organico e minerale all'interno del tubo digerente, oppure dall'azione dei molluschi (lumache) che secernono sostanze mucose cementanti.

La pedofauna può in alcuni casi contribuire alla mineralizzazione di alcuni composti organici. Infatti, ingerendo i residui vegetali, alcune molecole più semplici possono essere decomposte. I lombrichi, per esempio, sono in grado di produrre escrementi particolarmente ricchi di azoto e fosforo, mentre altri detritivori possono metabolizzare degli inibitori dell'attività batterica quali i tannini presenti sulle foglie. Gli organismi che vivono nel suolo instaurano hanno un ruolo fondamentale nella stimolazione e nel rinnovo della microflora, in quanto gli animali che si cibano della lettiera, ingeriscono parte dei microrganismi che, conseguentemente, sono incentivati a proliferare e a rigenerare continuamente nuovi individui. La pedofauna è anche importante per la diffusione della microflora lungo il profilo di un suolo, poiché sulla superficie degli animali si possono depositare delle spore fungine e delle cellule batteriche che costituiscono la fonte di inoculo in ambienti privi o poveri di microrganismi (Tarello, 2004).

1.2 Qualità del suolo e contaminazione

Il suolo è un'entità estremamente complessa in cui hanno sede molteplici interazioni tra le componenti abiotica e biotica e nella quale avvengono processi di degradazione e ricircolo della sostanza organica e dei nutrienti. Inoltre, i suoli sono le più grandi riserve di biodiversità della Terra ed importanti habitat per procarioti ed eucarioti, e una grande varietà di invertebrati. Oltre al loro ruolo di biodiversità, i suoli sono anche fondamentali da un punto di vista funzionale, nel sostenere tutte le forme di vita terrestre e nel provvedere a molte funzioni dell'ecosistema.

La valutazione della qualità ecologica di un suolo richiede l'integrazione di variabili fisiche, chimiche e biologiche. Da un punto di vista biologico, il mantenimento della biodiversità e delle funzioni che sostengono la sicurezza della vita sono i principali scopi per assicurare un uso sostenibile del suolo (Breure *et al.*, 2005).

Storicamente, il concetto di qualità del suolo è stato intrinsecamente associato con i limiti o con l'idoneità di un suolo ad un determinato uso (Seybold *et al.*, 1997). In seguito la definizione di qualità del suolo è cambiata, il concetto è stato legato alla “capacità di un suolo a funzionare entro i limiti dell'ecosistema per sostenere la produttività di piante e animali, mantenere o migliorare la qualità dell'acqua e dell'aria e sostenere l'occupazione e la salute umana”. In definitiva la qualità è la capacità del suolo a funzionare (Karlen *et al.*, 1997). Questo concetto è fortemente collegato al ruolo del suolo nell'ecosistema ed è dipendente dalle interazioni con altri compartimenti come il biota, l'aria e l'acqua. Rispetto all'aria e all'acqua, il suolo possiede caratteristiche (potere assorbente, capacità tampone, attività biotica, ecc.) in grado di trattenere contaminanti ambientali. Questa sua capacità di autodepurazione è in grado di smorzare gli effetti negativi derivanti dall'immissione di sostanze inquinanti. La capacità autodepurativa del suolo ha un limite, infatti l'eccessivo accumulo di contaminanti costituisce un pericolo potenziale, per gli altri compartimenti, di rilascio di inquinanti a seguito di variazioni delle condizioni ambientali (es. variazioni del pH). Negli ultimi decenni lo studio dei contaminanti di questo comparto ambientale sta ricevendo maggiori attenzioni a causa della loro pericolosità per l'ambiente e gli organismi viventi, compreso l'uomo. La contaminazione può avere importanti conseguenze in termini di capacità del suolo a funzionare. Il suolo può fallire nel sostenere la vegetazione e la produzione di biomassa, può non fornire materiale e

substrato prezioso per le attività umane, i sistemi ecologici e cicli biologici dei nutrienti o può non essere capace di fungere da filtro e tampone, influenzando l'idrosfera, compromettendo le riserve di falda e minacciando gli ecosistemi acquatici (van Straalen, 2002; Scullion, 2006).

La contaminazione dei suoli può avvenire per apporto di sostanze estranee di vario tipo e origine. Polveri, scorie, inerti, rifiuti solidi e liquidi, residui di lavorazioni industriali possono essere incorporati nel suolo o essere veicolati da acque irrigue e alluvioni, oppure possono depositarsi sulla sua superficie trasportati dal vento e dalle piogge; sui suoli possono poi pervenire metalli pesanti contenuti nei fanghi di depurazione urbana, fitofarmaci o loro metaboliti utilizzati sulle colture agricole, eccessi di nutrienti dovuti a fertilizzazioni inadeguate, materiali radioattivi ecc.

I contaminanti chimici possono essere riassunti in due principali categorie: 1) i composti organici, tra i quali si distinguono gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), che possono essere più o meno attaccati e trasformati dai microrganismi del suolo, producendo spesso dei composti intermedi, diversi da quelli originari, ma che possono essere a loro volta dei contaminanti; 2) i composti inorganici, in particolare metalli pesanti, che tendono ad accumularsi nei suoli, pur modificando il loro stato chimico-fisico.

Metalli pesanti

L'inquinamento da metalli pesanti recentemente è diventato uno dei più seri problemi ambientali, la loro presenza anche a basse concentrazioni può essere dannosa e tossica per la flora e per la fauna (Das *et al.*, 2008)

I metalli pesanti sono definiti chimicamente in base alla loro densità, superiore a 5 g cm³, ma ormai tale terminologia, è associata anche agli elementi che oltre a possedere le caratteristiche chimiche dei metalli hanno peso molecolare e atomico elevati. Sono presenti nel suolo, escluso ferro e alluminio, in concentrazioni molto basse dell'ordine di parti per milione o per miliardo e per tale motivo vengono definiti anche come elementi in tracce.

Tra i metalli pesanti si distinguono metalli indispensabili per gli organismi viventi, con potenziale tossicità (ferro, cobalto, cromo, rame, manganese, molibdeno, selenio, zinco) e metalli ritenuti prevalentemente tossici (alluminio, arsenico, berillio, cadmio, mercurio, nichel e piombo).

I metalli pesanti oltre ad essere presenti nel suolo per alterazione naturale delle rocce, possono essere immessi sotto forma di prodotti delle attività antropiche (attività agricole, insediamenti urbani e processi industriali).

In generale sono sostanze pericolose e sono molto persistenti nell'ambiente, si accumulano nella catena alimentare o nell'acqua (bioaccumulazione) e si depositano nei lipidi degli organismi biologici.

Per comprendere al meglio la loro pericolosità bisogna studiare il trasporto e la mobilità nel suolo che dipendono dal tipo e dalla natura del suolo, dalla concentrazione del metallo di interesse, dalla concentrazione e dal tipo di ioni che possono essere competitivi, dai leganti complessanti, sia organici che inorganici, dal pH, e dallo stato di ossidazione.

In suoli sabbiosi, i metalli cationici sono più mobili, mentre vengono assorbiti dalla frazione argillosa del suolo.

Il pH è un parametro chiave che controlla il trasferimento ed il comportamento dei metalli nel suolo. Quando il pH decresce, aumenta la competizione per i ligandi (OH^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- , S^- e fosfati) tra lo ione H^+ e i metalli disciolti, la conseguenza è una maggiore mobilità dei metalli nel suolo.

Anche la sostanza organica del suolo gioca un ruolo importante, infatti la complessazione degli ioni metallici con composti organici insolubili può fortemente diminuire la mobilità dei metalli.

Altri fattori come capacità di scambio cationico, temperatura, salinità, tempo di ritenzione del metallo, possono influenzare la distribuzione dei metalli pesanti nei suoli. Maggiore è la capacità di scambio cationico e maggiore è la mobilità dei metalli; quando la temperatura aumenta, l'assorbimento dei metalli da parte del suolo decresce gradualmente; se la salinità dell'acqua nel suolo aumenta la quantità dei metalli assorbiti dal suolo potrebbe decrescere per la competizione tra i metalli ed altri cationi (Peng *et al.*, 2009).

1.3 L'ecotossicologia

L'ecotossicologia studia gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici sugli organismi viventi, su popolazioni o comunità all'interno di un ecosistema definito, individuando i diversi tipi di trasporto di questi agenti e la loro interazione con l'ambiente (Butler, 1978).

Il termine "ecotossicologia" fu citato per la prima volta da Truhaut nel 1969 (Walker *et al.*, 1996) in riferimento agli effetti degli inquinanti su uno o più componenti di un sistema ecologico. Col passare degli anni, vennero poste le prime basi per la valutazione del rischio chimico non solo in riferimento all'uomo ma all'intera biosfera (Rand *et al.*, 1995).

Gli studi ecotossicologici fondano le loro radici nella tossicologia classica, scienza che focalizza la sua attenzione sull'uomo, e riguardano in maniera prioritaria gli effetti delle sostanze chimiche e delle radiazioni sui diversi livelli di organizzazione biologica, dall'individuo alla comunità (Wright e Welbourn, 2002). Con l'ecotossicologia, l'obiettivo non è più la semplice protezione dello stato di salute dell'individuo secondo criteri igienico-sanitari (tossicologia classica) ma piuttosto la conservazione dell'integrità funzionale degli ecosistemi, degli scambi materia ed energia, dei processi di interrelazione tra le componenti biotiche a tutti i livelli.

Le differenze sostanziali riguardano aspetti legati strettamente ai differenti ambiti in cui esse operano. Rispetto alla tossicologia classica, per un'analisi ecotossicologica occorre:

- individuare i percorsi dei diversi inquinanti, per identificare i bersagli biologici della contaminazione;
- caratterizzare e quantificare la dose di inquinante che è in grado di raggiungere i bersagli biologici, basandosi su informazioni riguardanti distribuzione e destino ambientale della sostanza (o miscela di sostanze) in esame;
- studiare i contaminanti non solo singolarmente ma anche in miscela, dal momento che normalmente così si ritrovano nei sistemi naturali;
- studiare la tossicità su molte specie differenti dall'uomo (saggi multispecie), prendendo in esame i meccanismi d'azione sia diretti che indiretti;
- valutare la tossicità a livello di comunità biologica, utilizzando appropriate scale spazio-temporali.

Nella maggior parte dei casi i composti tossici non sono di origine naturale (xenobiotici) oppure, se di origine naturale, sono presenti in quantità o forma tali da determinarne la tossicità. Ad esempio, i metalli pesanti sono presenti in natura generalmente in forma inerte (come ossidi o solfuri poco solubili) e, pertanto, modestamente pericolosi; ben differente è la situazione che vede la liberazione conseguente ad attività antropiche di metalli pesanti in forma solubile. I contaminanti organici, invece, generalmente si legano alla componente apolare tanto degli organismi quanto dei vari comparti ambientali: è questa una delle cause, della biomagnificazione nella catena trofica di questi composti che si salda stabilmente alla parte lipidica e incrementano la loro concentrazione passando da un organismo all'altro della catena alimentare. Il destino di uno xenobiotico è determinato dalle sue proprietà chimico-fisiche intrinseche, dalle proprietà chimico-fisiche e biologiche dell'ambiente e dalla quantità in cui è rilasciato nell'ambiente stesso. Occorre poi tenere conto delle interazioni fra i vari composti, i quali possono dare origine a fenomeni di sinergia oppure di antagonismo. Si possono quindi verificare una riduzione o trasformazione dei composti all'interno delle varie matrici, che possono dare come risultante un incremento o una diminuzione del potenziale tossico della sostanza di partenza, oppure una sua attivazione/disattivazione (ad esempio, la complessazione dei metalli li rende inerti e li lega al suolo, mentre la loro forma ionica libera determina una forte tossicità) (APAT, 2006).

E' importante anche tenere in considerazione processi di tipo biologico che possono avvenire all'interno del comparto ambientale che si sta esaminando quali bioconcentrazione (processo di fissazione e accumulo di sostanze da parte dell'organismo nei propri organi o tessuti), biomagnificazione (progressiva concentrazione e accumulo degli inquinanti nei loro passaggi successivo attraverso la catena alimentare) e biodegradazione (trasformazione biologica di una sostanza complessa in altre più semplici).

La scelta delle sostanze da analizzare si fonda su considerazioni relative alla produzione, all'utilizzo, all'eventuale dispersione nell'ambiente, alla possibilità di accumulo nei sistemi biologici, alla resistenza alla degradazione, al potenziale tossico. E' importante esaminare non solo le sostanze che sono caratterizzate come tossiche per definizione, ma anche tutte quelle che possono produrre squilibri trofici (come i nutrienti e la materia organica) e quindi alterare la composizione degli ecosistemi in modo più o meno permanente.

In definitiva gli studi ecotossicologici possono verificare gli effetti indesiderati che sono avvenuti o che avvengono nell'ambiente a causa dell'immissione di una singola sostanza o miscele di sostanze, almeno in parte potenzialmente tossiche, tenendo conto delle interazioni fisiche, chimiche e biologiche con le diverse componenti, biotiche ed abiotiche dell'ambiente stesso.

Test di tossicità

I primi saggi di tossicità risalgono al 1863 per opera di Penny e Adams, ma i primi 'tests standard' vennero pubblicati nel 1945 (Hart *et al.*, 1945) e successivamente adottati dalla 'American Society for Testing and Materials' (ASTM). I metodi si basavano sulla presenza o l'assenza di specie, popolazioni, comunità come indicatori delle condizioni ambientali, in aggiunta alle analisi chimico-fisiche utilizzate nella tossicologia classica (Hoffmann *et al.*, 1995). Per raggiungere l'obiettivo della valutazione causa-effetto di singoli agenti chimici si propose di procedere con un approccio multidisciplinare, integrando i metodi chimico-fisici con i metodi biologici. I principi su cui si fondano i test di tossicità sono rivolti alla valutazione delle risposte di organismi in presenza (esposizione) di agenti tossici, tenendo in considerazione che tali risposte dipendono strettamente dalla dose dell'elemento tossico (livello di esposizione) e dal tempo di esposizione (Heath, 1995; Rand *et al.*, 1995). Infatti, perché si manifesti un effetto è necessario che la sostanza entri nell'organismo e rimanga in contatto, in quantità e per un tempo sufficiente, con le strutture cellulari ed eventualmente con uno specifico bersaglio.

I test ecotossicologici possono essere classificati in funzione del livello biologico di organizzazione, del periodo di esposizione e dell'endpoint (Forbes e Forbes, 1994).

Test a livello di singola specie, di multispecie e test di ecosistema offrono differenti visioni del comportamento e degli effetti dei contaminanti. I test su singola specie sono quelli maggiormente diffusi perché sono generalmente di facile esecuzione ed interpretazione rispetto agli altri due. I test multispecie sia a livello di comunità che di ecosistema permettono di rilevare l'effetto indiretto dei contaminanti, che sono il risultato dell'interazione delle specie, e l'effetto tossico diretto.

Un test invece distinto in base al periodo di esposizione dell'organismo può essere acuto, subcronico e cronico. I periodi di esposizione vengono definiti in base alla durata del ciclo vitale dell'organismo test. I test acuti sono di breve durata e rilevano effetti avversi che si manifestano in un breve arco temporale successivo alla

somministrazione di una dose singola di sostanza. I test subcronici evidenziano effetti dovuti all'esposizione ad una sostanza per un periodo inferiore o uguale ad un decimo della vita dell'organismo. Infine i test cronici stimano gli effetti che si manifestano in seguito a esposizioni per un tempo superiore, che spesso coincide con più della metà della durata di vita dell'organismo test.

Un'ulteriore criterio di classificazione dei test ecotossicologici è relazionato alla misura degli endpoint. Endpoint letali e subletali vengono utilizzati per indagare effetti differenti. La mortalità spesso viene utilizzata come misura della tossicità per uno screening dei composti chimici analizzati. Gli endpoint subletali invece mostrano gli effetti sulla crescita, riproduzione e comportamento, oltre a vari indici fisiologici, morfologici, biochimici e molecolari.

I test possono essere condotti utilizzando una singola specie o più specie diverse, in esperimenti indipendenti. La scelta della (o delle) specie è particolarmente importante, e può essere effettuata sulla base di differenti criteri, a seconda dello scopo. Si può scegliere ad esempio di utilizzare specie indigene dell'ambiente da proteggere, in funzione della rilevanza ecologica (specie chiave nella catena alimentare), dell'importanza economica o della facilità di reperimento e semplicità di gestione (disponibile e/o allevabile). Spesso però si utilizzano specie particolari, in funzione della sensibilità ai composti tossici, delle disponibilità del laboratorio, della standardizzazione dei metodi.

Poiché nessun organismo è in grado di coprire l'intera varietà di risposte agli stressori e di rispondere a vari range di concentrazioni di xenobiotici, è consigliabile impiegare una batteria di saggi ecotossicologici in cui gli ambiti di sensibilità non si sovrappongano ma siano complementari. I componenti della batteria vengono solitamente scelti in base alla loro rappresentatività (un procariote, un vegetale, un animale superiore) ed in base alle loro relazioni con la catena trofica.

1.4 Valutazione della tossicità dei suoli

Il suolo è una matrice complessa che si comporta come un filtro per la maggior parte dei contaminanti che si trovano in ambiente terrestre. Metalli pesanti ed IPA, ad esempio, vengono assorbiti dalla matrice suolo, diventando così meno mobili con una conseguente riduzione della tossicità per gli organismi viventi (Aruoja *et al.*, 2004). Questa capacità di trattenere gli inquinanti non deve però sottovalutare quello che è il potenziale tossico dei contaminanti che possono rendersi biodisponibili a seguito di variazioni delle condizioni ambientali.

La biodisponibilità è la risultante di complessi processi di trasferimento di massa e di assorbimento che sono determinati dalle proprietà delle sostanze, dalle caratteristiche specifiche del suolo e dai biochimismi degli organismi interessati.

La dimensione e la natura degli effetti di un contaminante sono determinati oltre che dalla concentrazione anche dalla forma chimica; infatti se la concentrazione di un contaminante che raggiunge l'organo bersaglio è molto bassa, oppure è tale da non interagire con un organismo, non si osserva alcun effetto negativo. Al contrario se un composto è presente in elevata concentrazione in forma biodisponibile, si possono verificare effetti letali anche in tempi molto brevi. Tra le due situazioni estreme, si collocano gli effetti, non letali, ma sempre negativi, determinati dalla frazione biodisponibile quali ad esempio una ridotta attività metabolica o riproduttiva, accompagnati da una crescente sensibilità agli stress chimici o fisici (Petruzzelli e Pedron, 2007).

Oltre agli effetti provocati dai contaminanti biodisponibili si devono considerare quelli determinati dal diretto contatto del biota col suolo. Un esempio può essere rappresentato dai lombrichi, che vivono a stretto contatto con questa matrice e ingeriscono particelle di suolo. Sono noti infatti sia effetti tossici provocati da composti policiclici aromatici nei confronti di questi invertebrati (Sverdrup *et al.*, 2002), che la loro capacità di bioaccumulare metalli pesanti, che possono provocare effetti negativi sulla crescita e sulla riproduzione del lombrico (Nahman *et al.*, 2007). Per valutare in maniera più completa la tossicità di un suolo è necessario utilizzare una batteria di saggi ecotossicologici, adoperando specie che appartengono a livelli di organizzazione biologica differenti (Eom *et al.*, 2007). I saggi ecotossicologici possono essere condotti sia sulla matrice solida che sull'estratto acquoso del suolo. I risultati ottenuti dall'estratto acquoso consentono di evidenziare la tossicità dei

contaminanti biodisponibili, inoltre aiutano a comprendere quale potrebbe essere il rischio ecotossicologico, dovuto alla lisciviazione e trasporto di queste sostanze, per la falda acquifera. I risultati ottenuti dalla matrice tal quale evidenziano la tossicità globale del suolo perché simulano meglio la situazione reale dove avvengono anche interazioni tra le sostanze, la matrice e gli organismi.

Una importanza rilevante assume la scelta delle specie da utilizzare nelle batterie di saggi ecotossicologici per valutare la tossicità dei suoli. Solitamente vengono utilizzati organismi che possono essere rappresentativi del suolo, che sono facilmente reperibili o allevabili, che abbiano una certa sensibilità ai contaminanti indagati.

Le batterie di test sul suolo tal quale spesso utilizzano organismi come le piante e invertebrati terrestri (lombrichi, ostracodi, collemboli, ecc.). La batteria più comunemente utilizzata per saggiare la tossicità degli estratti e delle matrici acquose in generale è composta principalmente da un batterio, un'alga unicellulare e da un crostaceo (Eom *et al.*, 2007).

Per caratterizzare un suolo quindi sono necessari sia i saggi ecotossicologici condotti sul suolo che quelli condotti sull'estratto acquoso, anche se non è dimostrata nessuna diretta relazione tra i risultati ottenuti dalle due differenti matrici.

Saggi ecotossicologici sulla matrice suolo tal quale

Tra saggi ecotossicologici di contatto più diffusi ci sono quelli che utilizzano le piante. Le piante sono componenti essenziali per l'ecosistema e si trovano alla base della catena alimentare. Quando crescono su un suolo contaminato diventano una potenziale minaccia per la salute degli animali e dell'uomo, in quanto possono accumulare sostanze tossiche (es. metalli pesanti) nei loro tessuti.

Le piante hanno anche la proprietà, attraverso la produzione di essudati dalle radici, di acidificare il suolo e quindi di poter legare i metalli presenti modificandone la mobilità. Altra proprietà fondamentale degli essudati è quella di fungere da risorsa organica per i microrganismi del suolo, che favoriti dalle condizioni della rizosfera, interagiscono positivamente con la pianta mediante la produzione di sostanze che possono essere assorbite dalle radici (Morel, 1997).

Studiare gli effetti tossici dei contaminanti del suolo sulle piante è molto importante proprio per il ruolo ecologico che esse ricoprono. I test di fitotossicità con diverse specie di piante vengono comunemente utilizzati (Hamdi *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2007; Hubalek *et al.*, 2007; Leitgib *et al.*, 2007) perché sensibili a diversi tipi di

contaminanti. Gli endpoint normalmente osservati per questi test sono la germinazione e l'allungamento radicale, ma è possibile effettuare anche studi sulla produzione di biomassa e sul bioaccumulo di metalli pesanti (An, 2004).

Oltre alle piante esiste un'enorme varietà di forme di vita tra gli invertebrati che vivono permanentemente o temporaneamente nel o sul suolo. Essi svolgono un ruolo fondamentale a livello locale ed esercitano funzioni indispensabili, quali la decomposizione della sostanza organica, la fissazione dell'azoto, il sequestro e il riciclo di carbonio e dei nutrienti, scavano cavità che permettono una circolazione agevolata dell'acqua, consumano in misura rilevante la sostanza organica in decomposizione e controllano in numero e qualità le reti trofiche dell'ecosistema.

I saggi ecotossicologici che utilizzano organismi della fauna terrestre comprendono specie molto diverse tra loro. Tra quelli più utilizzati vi sono i saggi su nematodi, collemboli e lombrichi (Roh *et al.*, 2009; Crouau e Pinelli, 2008; Nahmani *et al.*, 2007). Le specie adoperate in questi test, vengono selezionate in funzione della sensibilità ai contaminanti del suolo, della allevabilità in laboratorio, dell'elevato tasso di riproduzione e dei risultati che possono essere ottenuti in un tempo relativamente breve (Van Gestel *et al.*, 1996). Gli endpoint osservati possono variare molto in funzione della specie adoperata, ma generalmente vengono valutati effetti sulla sopravvivenza, riproduzione, crescita corporea, bioaccumulo di sostanze tossiche.

Oltre alle piante e alla pedodofauna esistono organismi che non vivono nel suolo ma che sono e ampiamente utilizzati nelle analisi ecotossicologiche. Tra questi i più diffusi sono: il saggio cronico con l'ostracode *Heterocypris incongruens* (Chial e Persone, 2003) che vive nelle pozze temporanee, in bacini ed estuari, nelle risaie, ma si localizzano prevalentemente nell'interfaccia tra acqua e suolo/sedimento; il saggio acuto in sospensione di suolo con il batterio marino bioluminescente *Vibrio fischeri* (Parvez *et al.*, 2006).

Saggi ecotossicologici sull'estratto acquoso del suolo

La valutazione della tossicità dei suoli può essere determinata anche attraverso saggi su organismi acquatici, utilizzando come matrice l'estratto acquoso del suolo. Questo tipo di indagine ecotossicologica è importante perché evidenzia la tossicità dei contaminanti biodisponibili presenti nel suolo e quindi il potenziale rischio per la

falda acquifera. I risultati di tossicità ottenuti dai saggi su estratto acquoso servono quindi ad integrare quelli ottenuti dai saggi sul suolo tal quale.

I test su matrice acquosa impiegano diversi tipi di organismi, ma la batteria di saggi più comunemente utilizzata è composta da un batterio, un'alga unicellulare e un crostaceo, organismi che appartengono a livelli trofici differenti e sensibili a vari tipi di contaminanti (Eom *et al.*, 2007). La maggior parte di questi saggi sono standardizzati, di semplice esecuzione e valutano endpoint sia di tipo acuto che cronico.

Il test acuto con *V. fischeri* è basato sull'inibizione della naturale bioluminescenza del batterio marino gram negativo (ISO, 1998). La produzione di luce è direttamente proporzionale all'attività metabolica del batterio ed ogni inibizione dell'attività enzimatica causa una corrispondente diminuzione della bioluminescenza. Questo organismo può essere utilizzato per testare la tossicità di molti tipi di contaminanti. La grande diffusione del test con *V. fischeri* è dovuta principalmente al fatto di essere molto sensibile, rapido, riproducibile e con costi contenuti (Parvez, 2006).

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici: l'ossigeno prodotto mediante il processo fotosintetico è indispensabile per la sopravvivenza delle specie animali. La modificazione della comunità fitoplanctonica causata da effetti tossici può alterare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema. Il saggio algale, eseguito con alghe verdi unicellulari, è un valido strumento d'indagine capace di fornire risposte utili nell'attività di monitoraggio ambientale e nella previsione dell'impatto sui recettori da parte degli scarichi idrici. Il test cronico d'inibizione della crescita algale studia l'effetto tossico di una sostanza chimica sulle diverse generazioni di un clone algale. L'utilizzo della specie *Selenastrum capricornutum* negli ultimi anni è diventato uno strumento di indagine molto diffuso per monitorare gli ambienti acquatici. Dati di letteratura indicano che è molto sensibile sia ai contaminanti organici (Tsai e Chen, 2007) che a quelli inorganici (Janssen e Heijerick, 2003; Kahru *et al.*, 2005).

Un saggio molto diffuso e utilizzato internazionalmente per lo screening della tossicità dei composti chimici e per monitorare gli effluenti industriali è indubbiamente il test di tossicità acuto con *Daphnia magna*. Il motivo del grande utilizzo di questa specie è dovuto alla sua ampia distribuzione in diversi habitat, al suo ciclo vitale relativamente breve, alla semplicità di allestire allevamenti anche in laboratorio, al suo ruolo nella catena alimentare e alla riproduzione partenogenetica.

La scelta dell'endpoint per la valutazione della tossicità è differente in funzione dei differenti protocolli metodologici. Le organizzazioni internazionali come ISO e OECD hanno adottato come criterio l'immobilizzazione, ovvero l'incapacità dell'organismo a muoversi entro 15 secondi dopo una delicata agitazione, mentre le organizzazioni del nord America (US EPA, ASTM) parlano di mortalità come endpoint finale. La mortalità dell'organismo in ogni caso è il criterio maggiormente utilizzato per la tossicità acuta degli invertebrati (Persoone, 2009).

2. SCOPO DELLA RICERCA

La valutazione della tossicità di un suolo contaminato risulta complessa, in quanto la contaminazione solitamente riguarda diversi tipi di inquinanti, alcuni dei quali non vengono analizzati e i cui effetti possono essere ridotti o amplificati dalle interazioni tra i diversi composti presenti. I suoli, inoltre, possiedono differenti proprietà chimico-fisiche (tessitura, pH, ecc.) che possono influenzare gli organismi, la biodisponibilità dei nutrienti, il trasporto e la disponibilità degli inquinanti presenti.

Le batterie di saggi ecotossicologici applicate alle diverse matrici del suolo (tal quale ed estratti) possono fornire utili informazioni sugli effetti tossici dei suoli contaminati. Risulta comunque difficile integrare e comparare i risultati ottenuti dalle batterie su suolo e su estratti perché utilizzano organismi differenti. L'unico organismo attualmente utilizzato sia per la matrice suolo che per l'estratto acquoso è il batterio *V. fischeri*.

L'obiettivo del presente lavoro di ricerca è stato sviluppare, mettere a punto, e applicare una batteria di test ecotossicologici idonea a valutare la tossicità dei suoli.

La prima parte della ricerca ha avuto come scopo la selezione e l'implementazione di una batteria di saggi ecotossicologici sul suolo tal quale. La batteria di partenza scelta è composta dal batterio *V. fischeri*, da tre specie di piante (*S. saccharatum*, *L. sativum*, *S. alba*), da un crostaceo (*H. incongruens*) e un lombrico (*E. fetida*). L'implementazione ha riguardato la sperimentazione di nuovi test ecotossicologici su suolo mediante l'utilizzo di specie acquatiche, al fine di rendere confrontabili i risultati con quelli ottenuti dall'estratto acquoso del suolo. Per le prove di messa a punto dei nuovi test sono state utilizzati il cladocero *D. magna* e l'alga unicellulare *S. capricornutum*, perché insieme al batterio *V. fischeri* sono gli organismi più utilizzati in una batteria ecotossicologica sull'estratto acquoso del suolo.

La seconda parte del lavoro ha riguardato l'applicazione della batteria di saggi ecotossicologici selezionata a suoli campionati nell'area urbana di Napoli. Le analisi ecotossicologiche sono state condotte sia sul suolo tal quale che sugli estratti acquosi. I risultati di tossicità sono stati confrontati con le concentrazioni dei metalli al fine di verificare le possibili correlazioni. Inoltre per integrare i risultati di tossicità in un unico valore e per attribuire un giudizio di rischio ecotossicologico ai suoli campionati, è stato sviluppato un indice di tossicità sintetico. L'indice è stato

utilizzato anche per confrontare tra loro le matrici del suolo e per verificare quanto i risultati ottenuti dalla batteria selezionata riflettano il grado di contaminazione dei metalli indagati. L'indice di tossicità inoltre può consentire di verificare l'idoneità della batteria selezionata nella valutazione della tossicità dei suoli.

3. MATERIALI E METODI

La ricerca si è articolata in due fasi principali. Durante la prima parte del lavoro sono state condotte una serie di prove sperimentali per mettere a punto due nuovi test sul suolo. Le specie scelte per queste prove sono state: il cladocero *Daphnia magna* e l'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum*.

La seconda parte del lavoro ha riguardato l'applicazione di una batteria di saggi ecotossicologici a quattro suoli campionati nell'area urbana di Napoli nel 2008 e nel 2009. I suoli sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico (pH, capacità di campo, tenore idrico, sostanza organica, contenuto di carbonio e azoto, tessitura) ed è stato analizzato il contenuto di otto metalli (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn), sia nella frazione totale, disponibile che negli estratti acquosi. Le analisi ecotossicologiche sono state condotte sia sul suolo tal quale che sull'estratto acquoso de suolo.

Le prove sperimentali per la messa a punto dei nuovi saggi e le analisi ecotossicologiche del presente lavoro di ricerca, sono state condotte presso il laboratorio di biologia ed ecotossicologia del Centro di Ricerche Enea di Portici (NA).

3.1 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con D. magna

Il saggio cronico con *D. magna* sul suolo è stato sviluppato facendo riferimento, in parte, al protocollo standard del medesimo test su matrici acquose (OECD, 1998). Il saggio ha lo scopo di valutare gli effetti sulla riproduzione della daphnia dopo 21 giorni di esposizione al campione.

La procedura standard OECD prevede l'esposizione di 10 individui neonati (< 24 ore) ciascuno in 50-100 ml del campione/diluizione da testare. L'alimentazione prevede la somministrazione di una sospensione di alghe verdi unicellulari tre volte a settimana. Le condizioni di temperatura e luce devono essere mantenute costanti nel periodo di sperimentazione (T = 18-22°C, fotoperiodo con 16 ore di luce e 8 di buio). La frequenza del rinnovo del mezzo dovrebbe essere preferibilmente tre volte a settimana. Il rinnovo viene eseguito con il trasferimento delle daphnie mediante una micropipetta in una seconda serie di camere test contenenti il campione. I neonati

prodotti devono essere contati e rimossi preferibilmente ogni giorno. La mortalità deve essere registrata e i giovani prodotti dagli individui che non sopravvivono fino al termine del test, non devono essere calcolati nella media finale di riproduzione. La riproduzione viene espressa come media del numero di neonati/individuo.

La prima fase della presente sperimentazione è stata quella di definire le procedure di allestimento e di esecuzione del saggio. La necessità di rinnovare il mezzo (due volte a settimana), per consentire le condizioni ottimali di sopravvivenza e crescita della daphnia, ha portato alla scelta di un allestimento contestuale di tutte le camere test, comprese quelle per i rinnovi (fig. 3.1). La preparazione del mezzo, eseguita al momento del rinnovo, non permetterebbe il rilascio in soluzione di eventuali sostanze tossiche, presenti nel suolo, e questo risulterebbe in contrasto con la valutazione degli effetti cronici sulla riproduzione. Inoltre la preparazione contemporanea delle camere test, mantenute nelle stesse condizioni (fotoperiodo e temperatura), minimizza le possibili variazioni ambientali che possono interagire con la riproduzione del cladocero.

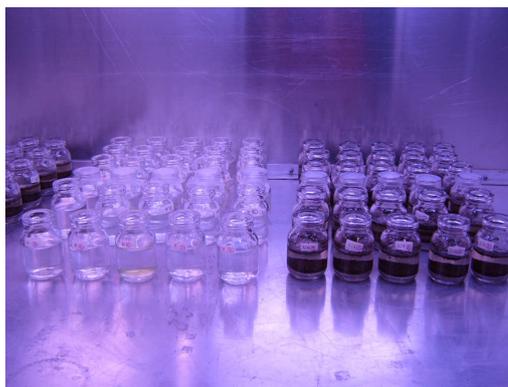


Figura 3.1. Allestimento contestuale delle camere test per l'esecuzione del saggio cronico su suolo con *D. magna*.

Stabilite le modalità di allestimento, la fase successiva ha riguardato una serie di prove svolte per definire le condizioni ottimali della camera test. Il primo presupposto è stato quello di minimizzare la quantità di suolo da impiegare per il test, per evitare l'uso di contenitori troppo grandi che allestiti contemporaneamente (minimo 30 per ogni campione, 5 repliche per 6 rinnovi) avrebbero richiesto condizioni logistiche e strumentali poco pratiche e dispendiose.

Il secondo presupposto è stato quello di cercare il minimo rapporto possibile tra suolo e acqua per ridurre la diluizione di eventuali sostanze tossiche presenti nel suolo.

Seguendo questi criteri, sono state effettuate una serie di prove con pesi totali (suolo + acqua), rapporti suolo/acqua e densità di organismi per camera test differenti. Per tutte le prove sono stati utilizzati il suolo standard OECD (par. 3.5.3) e un'acqua standard di allevamento per la *D. magna* (par. 3.5.9). La temperatura ($20\pm 2^\circ\text{C}$) e l'illuminazione (luce/buio 16/8 ore) sono state mantenute costanti per tutta la durata dell'esperimento. Parametri come il pH e l'ossigeno disciolto, sono stati monitorati, a campione, in fase di preparazione, all'inizio e alla fine del test. L'alimentazione, composta da una sospensione di cellule algali (*S. capricornutum*) e da una sospensione di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*), ognuna di esse con una concentrazione finale per camera test di $1,5 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} , è stata aggiunta due volte a settimana contestualmente ai rinnovi del mezzo e al trasferimento degli organismi. Le camere test sono state preparate pesando il suolo, aggiungendo acqua standard, fino ad ottenere il peso totale da testare, e miscelando il tutto con una pipetta Pasteur di plastica. La preparazione è stata eseguita 24 ore prima dell'inizio del test per consentire alle camere test di acclimatarsi alla temperatura di 20°C e per lasciare depositare il suolo. Il giorno successivo sono stati aggiunti gli organismi neonati (< 24 ore) provenienti da daphnie adulte della stessa età e mantenute in allevamenti controllati. Tutti i giorni, al più a giorni alterni, è stata registrata la sopravvivenza e sono stati contati e rimossi i neonati da ogni replica.

Le prove effettuate sono state:

- 1) peso totale di 30 g (suolo + acqua), rapporto suolo/acqua di 1:3, densità di 3 individui/camera test;
- 2) peso totale di 40 g (suolo + acqua), rapporto suolo/acqua di 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, densità di 3 individui/camera test;
- 3) peso totale di 50 g (suolo + acqua), rapporto suolo/acqua di 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, densità di 3 individui/camera test;
- 4) peso totale di 50 g (suolo + acqua), rapporto suolo/acqua di 1:3, densità di 1 individuo/camera test.

Tutte le prove sono state effettuate con 5 - 10 repliche per ogni singolo trattamento. Per ognuna di queste prove, parallelamente, è stata allestita, alle stesse condizioni, una prova con acqua standard (controllo negativo, K) con un peso totale identico a

quello testato. Questa prova è stata utilizzata per confrontare i risultati di riproduzione in assenza della matrice suolo.

Gli allevamenti sono stati monitorati, in due periodi dell'anno, per verificare il tasso di riproduzione degli organismi in condizioni standard.

Alle prove per la determinazione delle condizioni sperimentali del test, è seguita una fase per la definizione di un controllo positivo, ovvero di una sostanza di riferimento che inibisce la riproduzione ma non la sopravvivenza del cladocero. Questa definizione è necessaria anche per verificare la sensibilità del test.

Dal momento che non sono presenti in letteratura scientifica riferimenti per l'allestimento del controllo positivo per il saggio cronico con *D. magna*, sono state fatte alcune prove con suolo OECD arricchito con bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$). Il $K_2Cr_2O_7$ viene utilizzato come controllo positivo per il test acuto di mortalità con *D. magna* (ISO 6431, 1996). Sono state testate le seguenti concentrazioni di $K_2Cr_2O_7$ nel suolo: 0.575, 1.15, 2.3, 4.0, 4.6, 5.5, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 9.2 $\mu g g^{-1}$ peso secco.

Le prove con bicromato di potassio sono state condotte utilizzando un rapporto suolo/acqua di 1:3, peso totale di 50 g e 1 individuo/camera test.

Una quantità di una soluzione di $K_2Cr_2O_7$ è stata addizionata, in un Becker, al suolo OECD, tale da saturarlo e da ottenere la concentrazione finale desiderata in $\mu g g^{-1}$ di peso secco. Il suolo è stato conservato in frigo, al buio, a 4°C per 68-72 ore prima dell'allestimento delle camere test. Il giorno precedente all'esecuzione del test il suolo è stato distribuito nelle camere test, è stata aggiunta l'acqua standard, il campione è stato omogeneizzato e messo a decantare per 24 ore alle stesse condizioni del test. Il giorno successivo sono stati introdotti gli organismi neonati (1 per camera test) con età inferiore a 24 ore.

I risultati di riproduzione per tutte le prove sono stati espressi come media del numero totale di neonati/individuo, quelli di sopravvivenza come sopravvivenza media percentuale.

3.2 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con S. capricornutum

La messa a punto del test su suolo con l'alga unicellulare *S. capricornutum*, adoperata generalmente su matrici acquose (EPA, 1994), è partita da alcuni riferimenti in letteratura scientifica riguardanti saggi sperimentali con *S. capricornutum* (Baun *et al.*, 2002; Aruoja *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2007). I saggi

sperimentali esistenti utilizzano procedure ed endpoint diversi tra loro. Baun *et al.* (2000) propongono un test con una sospensione suolo/acqua di 1:5, sonicata e poi agitata per 24 ore. A questa sospensione viene aggiunto l'inoculo algale (10^4 cellule ml^{-1}) e per ogni replica vengono utilizzati 4 ml del preparato. I campioni vengono incubati a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ in agitazione e viene valutato come endpoint finale la fluorescenza dopo 0, 24 e 48 ore. Aruoja *et al.* (2004) utilizzano una sospensione suolo/acqua di 1:99, miscelata per 24 ore a cui viene addizionata una soluzione di nutrienti per la crescita algale. Successivamente l'inoculo algale viene aggiunto a 5 ml della sospensione, la quale viene incubata per 72 ore in agitazione a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Gli endpoint finali valutati sono la densità ottica e la misura della fluorescenza della clorofilla estratta. Chung *et al.* (2007), infine, utilizzano 20 g di sabbia secca addizionati con una soluzione per coltura algale (6 ml per saturare la sabbia più 1 ml). L'inoculo algale viene eseguito in modo da ottenere una concentrazione iniziale di $5 \cdot 10^5$ cellule g^{-1} di peso secco. I campioni vengono incubati a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ per 4 giorni con fotoperiodo di luce/ buio 16/8 ore. Dopo 4 giorni per separare la sabbia dalle alghe, i campioni vengono centrifugati (2 volte) e viene prelevato il surnatante con le alghe. Vengono valutati tre differenti endpoint: densità ottica, fluorescenza e concentrazione di clorofilla *a*.

Per la messa a punto del test cronico su suolo con *S. capricornutum* sono state effettuate una serie di prove per definire i parametri di crescita ottimali per le alghe in presenza della matrice suolo. Sono stati testati diversi volumi totali (suolo + acqua), diluizioni del suolo con acqua, condizioni statiche/dinamiche del test, separazione o contatto dell'interfaccia suolo/acqua. Il suolo utilizzato in tutte le prove è un suolo standard artificiale (OECD, 1984) sterilizzato (121°C , 20 min). L'acqua utilizzata per le diluizioni è una soluzione standard (par. 3.5.8) per la crescita algale (EPA, 1994). L'inoculo algale è stato prelevato da una coltura in fase esponenziale di crescita, preparato 24 ore prima del saggio. La sospensione algale, proveniente dalla coltura, è stata centrifugata (2000 rpm per 5 minuti) e, dopo aver scartato il surnatante, è stata aggiunta una soluzione di NaHCO_3 (15 mg l^{-1}), e messa in incubazione a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

La preparazione del campione è stata effettuata direttamente nelle camere test, pesando prima il suolo e poi aggiungendo l'acqua standard. La concentrazione iniziale dell'inoculo algale è stata di 10^4 cellule ml^{-1} . Le camere test sono state incubate ad una temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$ per 96 ore, con fotoperiodo di 16 ore di luce

e 8 di buio. Dopo 96 ore è stata valutata la densità cellulare mediante conta al microscopio ottico (ZEISS-MC80) e con l'ausilio di una camera di Burker. Sono state effettuate 5 repliche per ogni prova. L'endpoint valutato è stata la crescita algale espressa come numero di cellule ml^{-1} .

Le prove effettuate sono state:

- 1) volume finale di 25 ml, diluizioni del suolo di 1:4 e 1:10, con agitazione delle camere test e senza nessuna separazione dell'interfaccia suolo/acqua;
- 2) volume finale di 25 ml, diluizioni del suolo di 1:4 e 1:10, in condizioni statiche delle camere test e con separazione dell'interfaccia suolo/acqua mediante un filtro di carta;
- 3) volume finale di 25 ml, diluizioni del suolo di 1:4 e 1:10, in condizioni statiche delle camere test e senza nessuna separazione dell'interfaccia suolo/acqua;
- 4) volume finale di 10 ml, diluizioni del suolo di 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, in condizioni statiche, senza nessuna separazione dell'interfaccia suolo/acqua.

Per ognuna di queste prove, parallelamente, è stata allestita, alle stesse condizioni, una prova con acqua standard (controllo negativo - K) con lo stesso volume finale testato. Questa prova è stata utilizzata per confrontare i risultati di crescita algale in assenza della matrice suolo. I test effettuati con un volume finale di 10 ml sono stati eseguiti in piastre Petri (\varnothing 5 cm) di plastica (fig. 3.2), per favorire la diffusione omogenea della luce (proveniente dall'alto), al termine del test i 10 ml di sospensione sono stati trasferiti in provette e centrifugati (300 rpm, 10 minuti), il surnatante è stato utilizzato per la conta al microscopio.



Figura 3.2. Prove del saggio cronico su suolo con *S. capricornutum* con 10 ml di volume finale.

Alle prove per la determinazione delle condizioni sperimentali del test, è seguita una fase per la definizione di un controllo positivo, ovvero di una sostanza di riferimento che inibisce la crescita algale. Questa definizione è necessaria anche per valutare la sensibilità del test.

Per le prove, non essendo presente una sostanza di riferimento per il test con il suolo, è stato utilizzato cloruro di zinco (ZnCl_2), la cui tossicità per le alghe in ambiente acquoso è stata ampiamente studiata (Blaise *et al.*, 1986; St. Laurent *et al.*, 1992; Chao e Chen, 2000; Muysen e Janssen, 2001).

Sono state testate le seguenti concentrazioni: 0.3, 0.42, 0.63, 0.95, 1.21, 1.43, 2.15, 2.41, 3.22, 4.83 mg l^{-1} . Le prove con cloruro di zinco sono state condotte utilizzando una diluizione del suolo di 1:100, volume finale di 10 ml e condizioni statiche del test.

E' stata preparata una soluzione di ZnCl_2 , utilizzando acqua standard, successivamente sono stati aggiunti 9,9 ml della concentrazione da testare a 0,1 g di suolo OECD, direttamente nella camera test. Si è proseguito poi con l'inoculo algale e l'incubazione.

I risultati della crescita algale di tutte le prove sono stati espressi come numero di cellule ml^{-1} .

3.3 Campionamento

I campionamenti di suolo sono stati effettuati a settembre 2008 e ad aprile 2009 in quattro siti a diverso impatto antropico (fig. 3): un'aiuola urbana confinante con una strada ad elevato traffico veicolare (ACT), un bosco urbano limitrofo ad una strada molto trafficata (MIA), un'aiuola confinante con una strada extraurbana caratterizzata da traffico a scorrimento veloce (TAN) ed un bosco in un'area remota protetta dal WWF non interessato da impatto antropico (SSV). In ciascun sito sono stati prelevati circa 10-20 campioni di suolo superficiale (0-10 cm), dopo la rimozione della lettiera, sotto alberi di *Quercus ilex* per minimizzare l'influenza della copertura vegetale sulle proprietà chimico-fisiche e biologiche del suolo, e poi sono stati mescolati per ottenere un campione omogeneo.

Dopo il prelievo i campioni di suolo sono stati setacciati (2 mm) per le successive analisi chimico-fisiche ed ecotossicologiche e conservati al buio a 4°C. Per l'analisi granulometrica sono stati utilizzati i suoli non setacciati.



Figura 3. Siti nei quali sono stati effettuati i campionamenti.

3.4 Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli

I suoli dopo il campionamento sono stati utilizzati per determinare: il pH, la capacità idrica massimale, il tenore idrico, il contenuto di sostanza organica, il contenuto di carbonio e azoto, la tessitura, la concentrazione di otto metalli (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) come contenuto totale, nella frazione disponibile e nell'estratto acquoso del suolo.

3.4.1 pH

Il pH dei suoli è stato determinato attraverso un metodo potenziometrico. A 10 g di suolo fresco, pesato in beuta, sono stati aggiunti 25 ml di acqua deionizzata. Le beute sono state tenute in agitazione su un piano oscillante per 20 minuti e poi lasciate per altri 10 minuti a decantare. E' stato poi misurato il pH del surnatante attraverso l'utilizzo di un pHmetro.

La determinazione è stata effettuata su 3 repliche per ciascun campione.

3.4.2 Capacità idrica massimale (CIM)

La capacità idrica massimale, o capacità di campo, è stata determinata con il metodo gravimetrico su suolo fresco. Sono stati utilizzati per le misure, cilindri di plastica, a peso noto, aperti sulla sommità e con fondo forato ricoperto internamente da carta assorbente. I cilindri, nei quali sono stati pesati i campioni di suolo, sono stati immersi parzialmente in acqua deionizzata, fino ad ottenere la completa imbibizione del campione. E' stato determinato il peso a saturazione e i campioni sono stati essiccati in stufa a 105°C fino a raggiungimento di peso costante. Il valore della capacità idrica massimale è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{CIM (\%)} = (\text{peso netto a saturazione} - \text{peso netto secco}) / \text{peso netto secco} * 100$$

La determinazione della CIM è stata eseguita su tre repliche di ogni campione.

3.4.3 Tenore idrico (TI)

La determinazione del tenore idrico è stata effettuata pesando 5 g di campione fresco essiccato in stufa a 105° C fino a raggiungimento di peso costante.

Il tenore idrico dei campioni è stato espresso come percentuale del peso secco del campione ed è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{TI (\%)} = (\text{peso netto fresco} - \text{peso netto secco}) / \text{peso netto secco} * 100$$

Sono state effettuate tre repliche per ogni campione.

3.4.4 Sostanza organica (SO)

La sostanza organica dei suoli in esame è stata determinata mediante incenerimento. E' stato pesato 1 g di campione, essiccato in stufa a 105°C per 48 ore, in capsule di porcellana tarate poste in muffola a 550°C per 2 ore. Il valore della sostanza organica è stato espresso come percentuale del peso secco del campione ed è stato calcolato con la seguente formula:

$$SO (\%) = (\text{peso netto secco} - \text{peso netto calcinato}) / \text{peso netto secco} * 100$$

Sono state effettuate tre repliche per ogni campione.

3.4.5 Contenuto di carbonio e azoto

La determinazione del contenuto di carbonio e azoto è stata effettuata mediante analizzatore elementare. Sono stati pesati 5 mg di suolo essiccato e polverizzato in capsule di stagno utilizzando una microbilancia analitica. Le capsule sono state chiuse e poste nel campionatore dell'analizzatore elementare (Elemental Analyzer, Flash 112 Series EA). La calibrazione iniziale dello strumento è stata effettuata con un campione standard a contenuto di carbonio e azoto noti e due capsule vuote. La concentrazione di carbonio e azoto totale presente nel suolo viene espressa come percentuale in peso dell'elemento sul peso secco.

Tutti i campioni sono stati analizzati in triplice replica.

3.4.6 Tessitura

La tessitura è stata determinata attraverso setacciatura e analisi mediante sedigrafo. I risultati sono espressi come percentuali di sabbia, limo e argilla e le classi tessiturali fanno riferimento alla classificazione USDA (United States Department of Agriculture).

Questa analisi è stata eseguita dal laboratorio di geologia della sezione ACS PROT-CHIM del centro di ricerche Enea Casaccia di Roma.

3.4.7 Contenuto totale dei metalli

Per determinare la concentrazione totale dei metalli, i suoli sono stati essiccati in stufa a 105 °C e polverizzati. A 250 mg di campione, pesati in tubi di digestione in teflon, sono stati aggiunti 4 ml di HNO₃ (65%) e 2 ml di HF (50%), per il bianco sono stati utilizzate le stesse quantità dei due acidi senza l'aggiunta di suolo. I tubi sono stati chiusi ermeticamente con appositi tappi a pressione e posti in un fornello a

micoonde Milestone (Digestor/Dryng Module mls 1200) col seguente programma per la digestione:

1. 250 watt per 5 minuti;
2. 400 watt per 5 minuti;
3. 0 watt per 2 minuti;
4. 500 watt per 5 minuti;
5. 0 watt per 2 minuti;
6. 400 watt per 5 minuti;
7. 0 watt per 2 minuti;
8. 400 watt per 5 minuti;
9. 0 watt per 2 minuti;
10. 400 watt per 5 minuti.

Dopo il raffreddamento in un bagnetto d'acqua a temperatura ambiente, i tubi sono stati aperti e la soluzione ottenuta dalla digestione è stata trasferita in palloni volumetrici e diluita con acqua deionizzata fino ad un volume di 50 ml. Dopo la mineralizzazione i campioni sono stati analizzati attraverso spettrometria ad assorbimento atomico (Spectra AA220 FS, Varian). Le concentrazioni di Cd, Cr, Cu, Ni e Pb sono state determinate con atomizzazione mediante fornello di grafite e le concentrazioni di Fe, Mn e Zn sono state ottenute con atomizzazione mediante fiamma, a partire da una curva di taratura costruita utilizzando soluzioni a concentrazioni note e crescenti di ciascun elemento considerato. Le concentrazioni totali di Cd, Cr, Cu, Ni e Pb nei suoli sono state espresse in $\mu\text{g g}^{-1}$ peso secco del campione mentre quelle di Fe, Mn e Zn in mg g^{-1} peso secco.

Le analisi sono state condotte in triplice replica per ciascun campione.

3.4.8 Contenuto di metalli nella frazione disponibile

La frazione disponibile di ciascun metallo nel suolo è stata determinata mediante due differenti metodiche di estrazione in funzione del pH dei suoli.

Per i suoli con un pH > 6,5 l'estrazione è stata effettuata mediante la metodica riportata da Lindsay e Norwell (1978). Tale metodica prevede l'estrazione degli elementi con una soluzione preparata con 1,97 g di acido dietilentriamminopentacetico (DTPA), 1,47 g di calcio cloruro idratato e 14,92 g di trietanolammina, portata ad un valore di pH di $7,3 \pm 0,05$ con HCl 1N, e poi a volume di 1000 ml con acqua deionizzata. Sono stati pesati 25 g di campione

precedentemente essiccato in stufa a 105°C, ai quali sono stati aggiunti 50 ml di soluzione estraente.

Per suoli con pH < 6,5, l'estrazione è stata effettuata mediante la metodica riportata da Lakanen ed Ervio (1971). Per tale metodica, la soluzione estraente è composta da 38,5 g di ammonio acetato, 25 ml di acido acetico (99%) e 5,845 g di acido etilendiamminicotetracetico (EDTA), portata ad un valore di pH di $4,0 \pm 0,05$ con acido acetico e portati a volume di 1000 ml con acqua deionizzata. Sono stati pesati 10 g di campione, precedentemente essiccato in stufa a 105°C ai quali sono stati aggiunti 50 ml di soluzione estraente.

Dopo l'aggiunta dell'estraente, i campioni sono stati lasciati ad agitare su un piano oscillante per 120 minuti (estrazione con DTPA) e 30 minuti (estrazione con EDTA). Tutti i campioni sono stati filtrati con carta da filtro. Gli estratti ottenuti sono stati analizzati allo spettrometro ad assorbimento atomico (Spectra AA 220 FS Varian) con la medesima procedura indicata per il contenuto totale dei metalli.

3.4.9 Contenuto dei metalli nell' estratto acquoso del suolo

L'estratto acquoso del suolo è stato preparato pesando una quantità di suolo fresco corrispondenti a 250 g di peso secco e aggiungendo 750 ml di acqua deionizzata (diluizione 1:4). Il campione è stato sottoposto ad agitazione continua mediante agitatore magnetico per 30 minuti e lasciato sedimentare per 24 ore al buio a 4° C. La fase liquida è stata separata dalla matrice solida per aspirazione e successivamente è stata centrifugata e filtrata per eliminare la presenza di particelle solide residue. L'estratto ottenuto è stato analizzato mediante lo spettrometro ad assorbimento atomico con la medesima procedura utilizzata per determinare il contenuto totale dei metalli.

3.5 Analisi ecotossicologiche e selezione della batteria

Le analisi ecotossicologiche sono state condotte sia sul suolo tal quale che sull'estratto acquoso del suolo.

Le analisi ecotossicologiche sono state precedute da una fase di selezione della batteria da applicare ai suoli. La scelta si è basata principalmente su diversi fattori: la disponibilità di organismi standardizzati in allevamento; la semplicità di esecuzione dei test e la sensibilità degli organismi a specifici contaminanti; l'utilizzo diffuso di

alcuni organismi della batteria nello studio della tossicità dei suoli; i risultati ottenuti dalla messa a punto dei nuovi saggi di contatto con *D. magna* e *S. capricornutum*.

3.5.1 Saggi di tossicità sul suolo

La batteria di saggi ecotossicologici selezionata e applicata ai suoli campionati è composta da:

- Test acuto in fase solida con il batterio *Vibrio fischeri*;
- Test cronico su suolo con l'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum*;
- Test acuto e cronico di fitotossicità con una monocotiledone (*Sorghum saccharatum*) e due dicotiledoni (*Lepidium sativum* e *Sinapis alba*);
- Test acuto e cronico con l'ostracode *Heterocypris incongruens*;
- Test acuto e cronico con il lombrico *Eisenia veneta*.

I primi quattro test sono stati condotti sui campioni di suolo in entrambe le stagioni, il test con il lombrico è stato utilizzato sui suoli nell'anno 2009.

3.5.2 Test acuto in fase solida con il batterio *V. fischeri*

Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di un campione utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini Gram-negativi della specie *Vibrio fischeri* (ceppo NRRL-B-11177).

Il batterio *V. fischeri*, può emettere luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 490 nm, purché sia presente ossigeno. La sequenza di reazioni che provoca l'emissione di luce è associata alla catena respiratoria di trasporto degli elettroni ed è catalizzata dall'enzima luciferasi per ossidare simultaneamente la luciferina (un'aldeide ciclica contenente più di otto atomi di carbonio) e la riboflavina 5-P. La reazione di produzione della luce è la seguente:



dalla reazione tra luciferasi e il coenzima flavina, assieme con l'ossigeno e la luciferina si forma un complesso attivato che si degrada ed emette protoni responsabili della bioluminescenza (Perin, 2004)

Quando i batteri vengono a contatto con sostanze tossiche, si ha un abbassamento misurabile quantitativamente della luminescenza.

Ciascuno xenobiotico esplica la sua tossicità su dei siti d'azione specifici, quindi l'inibizione ha natura diversa per ogni xenobiotico, tuttavia, dato il legame tra l'emissione di bioluminescenza, la produzione di energia ed il trasporto di membrana,

si può dire che qualsiasi sia l'attività tossica del composto, questa ha delle ripercussioni sulla bioluminescenza.

Quindi la capacità di emettere luce è inversamente proporzionale al grado di tossicità del campione analizzato, ma alcune sostanze possono anche provocare l'effetto contrario, ovvero stimolare la produzione di luce.

I batteri utilizzati nel test sono liofilizzati, e conservati alla temperatura di -20 °C, quindi sono stati riattivati prima dell'uso, aggiungendo 1ml di soluzione ricostituente Microtox e lasciando agire per 30 minuti a 4°C.

Il test in fase solida con *V. fischeri* viene applicato seguendo la procedura standard (Microbics Corporation) del Solid Phase Test (SPT). Una quantità di suolo fresco equivalente a 7 g di suolo secco è stata sospesa con 35 ml di soluzione diluente Microtox SPT (soluzione di NaCl al 3,5%) e successivamente messa ad agitare mediante agitatore magnetico per 10 minuti. In seguito sono stati prelevati 1,5 ml della sospensione, durante l'agitazione, e sono state effettuate 8-12 diluizione seriali (fattore di diluizione pari a 2) con il diluente SPT. Il controllo è stato eseguito con diluente SPT senza l'aggiunta di suolo. A tutte le concentrazioni sono stati aggiunti 20 µl di sospensione batterica ricostituita, e lasciati agire per 20 minuti a $15 \pm 2^\circ\text{C}$. Per separare dalla matrice solida la fase acquosa con i batteri sono stati utilizzati dei filtri a colonna. Il campione filtrato (500 µl) è stato trasferito in cuvette di vetro e attraverso un fotometro (Microbics Model 500 Toxicity Analyzer) ed è stata misurata l'emissione di bioluminescenza dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione dei batteri al campione. Le letture sono state effettuate in duplice replica. I dati sono stati elaborati statisticamente dal software dello strumento (Microbics Corporation, Carlsbad, CA, USA) che fornisce i valori di tossicità come EC₅₀ (concentrazione alla quale si osserva il 50% di effetto) oppure come percentuali di effetto rispetto al controllo, laddove non è possibile calcolare il valore di EC₅₀.

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

I saggi di fitotossicità offrono la possibilità di evidenziare l'effetto cumulativo e/o sinergico di più agenti inquinanti, inoltre sono generalmente metodi veloci e con un impegno economico molto contenuto. Questo test valuta gli effetti sulla germinazione e sull'accrescimento radicale (EPA, 1996) di una monocotiledone

Sorghum saccharatum (sorgo) e due dicotiledoni *Lepidium sativum* (crescione) e *Sinapis alba* (senape).

Il controllo negativo è stato eseguito con un suolo artificiale (OECD, 1984), composto da: sabbia quarzosa (70%), argilla caolinitica (20%), torba di sfagno (10%).

In piastre Petri (Ø 10 cm) una quantità di suolo fresco equivalente a 10 g di peso secco è stata pesata e ricoperta con un filtro di carta (Ø 9 cm). Al suolo è stata aggiunta la quantità d'acqua deionizzata necessaria per la saturazione più altri 5 ml di acqua. In ogni piastra sono stati disposti sulla superficie del 10 semi. Le piastre sono state incubate, al buio per 72 ore a di $25 \pm 2^\circ\text{C}$, chiuse in sacchetti di polietilene per minimizzare l'evaporazione dell'acqua.

Al termine del test per ciascuna replica è stato contato il numero di semi germinati (lunghezza radice ≥ 1 mm). Gli apici radicali sono stati misurati su carta millimetrata.

Per esprimere contemporaneamente i due endpoint è stato calcolato un indice di germinazione (IG) mediante la seguente formula:

$$\text{IG} = L * n$$

dove L rappresenta la media della lunghezza delle radici ed n è il numero medio di semi germinati. I risultati sono stati espressi come percentuale di effetto rispetto al controllo.

3.5.4 Test acuto e cronico con l'ostracode *Heterocypris incongruens*

Gli ostracodi sono organismi bentonici localizzati prevalentemente nell'interfaccia tra acqua e sedimento e che, nutrendosi di particelle solide, risultano essere particolarmente sensibile alla tossicità rilasciata dal substrato. La specie *Heterocypris incongruens* viene considerata particolarmente adatta alle prove di tossicità del suolo perché sensibile agli inquinanti sia di origine organica che inorganica.

Il saggio con *H. incongruens* su matrice solida ha una durata di 6 giorni e valuta due differenti endpoint: la mortalità (effetto acuto) e l'inibizione della crescita (effetto cronico) rispetto ad un controllo. Il saggio viene effettuato utilizzando individui neonati schiusi da uova durature (cisti) conservate al buio a 4°C . Per il controllo viene utilizzato il suolo artificiale OECD (1984).

Prima dell'esecuzione del saggio, sono state schiuse le cisti di *H. incongruens* in una piastra Petri (Ø 5 cm) con 10ml di Standard Freshwater (SF) per 52h a luce continua

(3000 - 4.000 lux) ad una temperatura di 25 ± 2 °C. La composizione della Standard Freshwater è la seguente:

- MgSO_4 60 mg l^{-1} ;
- NaHCO_3 96 mg l^{-1} ;
- KCl 4 mg l^{-1} ;
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mg l^{-1} .

La SF deve essere conservata al buio a 4°C e prima di essere utilizzata deve essere areata e portata a temperatura ambiente.

Dopo 48 ore dall'inizio della schiusa delle cisti, si è proceduto ad un prefeeding con l'alga *Spirulina sp.* proseguendo l' incubazione per altre 4 ore.

Il test è stato effettuato in una piastra a sei pozzetti (\varnothing 4 cm) e sono stati utilizzati organismi neonati che hanno una lunghezza corporea iniziale compresa tra i 200 e 250 μm . La procedura (Chial e Persoone, 2003 modificato) ha previsto l' aggiunta ad ogni pozzetto di una quantità di suolo fresco equivalente a 400 mg di suolo secco, 4 ml di Standard Freshwater ed una sospensione algale di una popolazione di *S. capricornutum* con una concentrazione finale di $1,5 \cdot 10^7$ cellule ml^{-1} . La sospensione è stata agitata e lasciata decantare per 20 minuti.

Sono state trasferiti in ogni pozzetto 10 ostracodi, le piastre sono state chiuse con parafilm e coperchio e incubate al buio a 25 ± 2 °C per 6 giorni.

Al termine del test i sopravvissuti sono stati trasferiti in piastra multipozzetto per la conta e per la misura della lunghezza corporea. Le misure allo stereomicroscopio (Zeiss Stemi 2000-C) sono state effettuate mediante l'utilizzo di una scala graduata di 50 μm , dopo l'immobilizzazione gli ostracodi con una goccia di soluzione fissativa (Lugol). I risultati sono stati espressi come percentuale di mortalità (effetto acuto) e come percentuale di inibizione della crescita (effetto cronico) rispetto al controllo.

3.5.5 Test acuto e cronico con il lombrico *Eisenia veneta*

I saggi di tossicità con i lombrichi possono valutare differenti endpoint: mortalità, accrescimento, produzione di bozzoli, riproduzione. Il test acuto e cronico con il lombrico *E. veneta* ha avuto come scopo l'osservazione degli effetti tossici dei suoli campione sulla sopravvivenza e sull'accrescimento corporeo.

La specie è stata scelta in quanto disponibile in allevamento. I lombrichi sono stati allevati seguendo una procedura standard (OECD 222, 2004) in un suolo con

condizioni di umidità compresa tra 30% e 60%, ad una temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo luce/buio di 16/8 ore, con aggiunta di cibo settimanale (letame di bovino essiccato) e acqua deionizzata.

La prova è stata effettuata in contenitori con coperchi forati per permettere gli scambi gassosi tra suolo e atmosfera, ciascuno contenente l'equivalente di 500-600 g di suolo secco e portato al 40-60% della CIM due giorni prima dell'esposizione dei lombrichi. Per l'esecuzione del saggio sono stati utilizzati lombrichi con un peso iniziale unitario omogeneo (300-600 mg) e di età compresa tra due mesi e un anno, sessualmente maturi, con clitello ben sviluppato. In ogni replica sono stati trasferiti 5 organismi, e sono stati incubati a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con ciclo luce/buio di 16/8 ore, per 28 giorni. Per il controllo è stato utilizzato suolo OECD (OECD 208, 1984).

Una volta a settimana è stato aggiunto cibo e acqua. Alla fine del test sono stati contati e pesati gli individui sopravvissuti. I risultati sono stati espressi come percentuale d'effetto rispetto al controllo.

3.5.6 Saggi di tossicità sull'estratto acquoso del suolo

La batteria di saggi ecotossicologici selezionata e applicata agli estratti acquosi dei suoli campionati è composta da:

- Test acuto con il batterio *Vibrio fischeri*;
- Test cronico con l'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum*;
- Test acuto con il cladocero *Daphnia magna*.

L'estratto acquoso del suolo è stato preparato con la procedura descritta nel paragrafo 3.4.8.

3.5.7 Test acuto con il batterio *V. fischeri*

Prima dell'inizio del test batteri liofilizzati sono stati riattivati con 1 ml di soluzione ricostituente Microtox, lasciando agire per 30 minuti a 4°C .

Per gli estratti acquosi con salinità inferiore a 1%, il campione è stato corretto con Osmotic Adjustment Solution (OAS), una soluzione al 22% di NaCl, per incrementare la pressione osmotica. Il rapporto campione/OAS deve essere 10% (v/v). Sono state preparate 5-6 diluizioni seriali (fattore di diluizione pari a 2) dell'estratto mediante una soluzione di NaCl (2%) e tenute ad una temperatura di $15 \pm 2^\circ\text{C}$. Sono stati distribuiti 100 μl di batteri in tante cuvette vuote, pari al numero di

diluizioni preparate, ed è stata effettuata una lettura della bioluminescenza in assenza di campione (t_0). Alla fine della lettura iniziale sono stati aggiunti ad ogni cuvetta 900 μ l del campione e, a partire dall'esposizione dei batteri, sono state effettuate letture della bioluminescenza a 5, 15 e 30 minuti. Il controllo è rappresentato da una soluzione salina di NaCl al 2%. Tutti i campioni sono stati testati in duplice replica. I dati sono stati elaborati statisticamente dal software dello strumento (Microbics Corporation, Carlsbad, CA, USA) che fornisce i risultati di tossicità come EC_{50} (concentrazione alla quale si osserva il 50% di effetto) oppure come percentuali di effetto rispetto al controllo laddove non è possibile calcolare il valore di EC_{50} .

3.5.8 Test cronico con l'alga unicellulare *S. capricornutum*

Questo test di tossicità consiste nell'esposizione di una popolazione algale dell'alga verde unicellulare *S. capricornutum*, in fase esponenziale di crescita, al campione da analizzare. Dopo 96 ore di incubazione viene misurata la crescita nel campione e confrontata con quella ottenuta nel controllo. Il protocollo sperimentale si basa sulla procedura standard EPA (EPA, 1994).

I campioni di estratto acquoso sono stati filtrati con membrana a pori di diametro di 0,45 μ m prima di iniziare il test. A 100 ml di campione poi sono stati aggiunti 100 μ l di ciascuna delle soluzioni 1, 2, 3, 4 e 5 (EPA, 1994) descritta in tabella 3.1.

La soluzione di riferimento, o controllo, è stata preparata con 1000 ml di acqua ultrapura e 1 ml della soluzione descritta in tabella 3.1.

Sono state effettuate cinque diluizioni seriali (fattore di diluizione pari a 2) con la soluzione di riferimento. Successivamente sono stati distribuiti 10 ml di ogni diluizione e del controllo in piastre Petri (\varnothing 5 cm). Ad ogni piastra è stato aggiunto l'inoculo algale tale da ottenere una concentrazione iniziale per piastra di 10^4 cellule ml^{-1} . La sospensione algale per l'inoculo è stata preparata 24 ore prima del test a partire dalla coltura di mantenimento dove le alghe si trovano in fase esponenziale di crescita. La sospensione è stata prelevata dalla coltura algale, centrifugata (2000 rpm per 5 minuti) e, dopo aver aspirato il surnatante, le alghe sono state risospese con una soluzione di $NaHCO_3$ (15 mg l^{-1}) per evitare di apportare nutrienti aggiunti dalla coltura al saggio. La sospensione poi è stata tenuta 24 ore in incubazione a $24 \pm 1^\circ C$ per permettere alle alghe di consumare le riserve di nutrienti intracellulari.

Dopo l'aggiunta dell'inoculo le piastre sono state incubate per 96 ore a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ in condizioni statiche e con fotoperiodo luce/buio di 16/8 ore. Al termine del test è stata valutata la densità cellulare di ogni campione, mediante la conta delle cellule algali al microscopio ottico (ZEISS-MC80) con l'ausilio di una camera di Burker. Tutti i campioni sono stati testati in triplice replica. I risultati sono stati espressi come percentuale d'effetto rispetto al controllo.

Tabella 3.1. Composizione della soluzione standard per *S. capricornutum*

Soluzione	Composto	Concentrazione
1	NaNO_3	25,5 gr l^{-1}
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,7 “
3	K_2HPO_4	1,04 “
4	NaHCO_3	15 “
5	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	12,46 mg l^{-1}
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	4,41 “
	H_3BO_3	185,52 “
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	207,81 “
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160 “
	ZnCl_2	3,27 “
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,428 “
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,012 “
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,26 “

3.5.9 Test acuto con il cladocero *Daphnia magna*

Il test acuto con *D. magna* valuta la mortalità o immobilizzazione di organismi neonati esposti al campione per 24-48 ore.

La procedura sperimentale di questo test si basa sulla metodica standard OECD (OECD, 2004). Gli organismi utilizzati sono stati prelevati dall'allevamento mantenuto in condizioni controllate (APAT-IRSA/CNR, 2003).

Sono state preparate cinque diluizioni seriali (fattore di diluizione pari a 2) dell'estratto acquoso con acqua standard di allevamento. L'acqua di allevamento è stata preparata miscelando 1 litro di acqua minerale naturale (tab. 3.2) e un litro di soluzione preparata con acqua ultrapura sterile 5,1 ml di una soluzione di NaCl (1 g l^{-1}) e 10,4 ml di una soluzione di CaCl_2 (1 g l^{-1}).

Tabella 3.2. Composizione dell' acqua minerale impiegata nell'allevamento di *D. magna* (USL n°16-Padova).

Elemento	Concentrazione (mg l ⁻¹)
Na	2
K	0,6
Mg	13
Ca	36
HCO ₃	1,54
Cl	2,1
SO ₄	18
SiO ₂	9

Il test è stato effettuato, in piastre Petri (Ø 5 cm) nelle quali sono stati distribuiti 10 ml del campione. In ogni pozzetto sono stati trasferiti con una micropipetta 5 individui neonati (< 24 ore). Le piastre sono state incubate al buio a 20 ± 2 °C; durante il test gli organismi non sono stati alimentati. Il test è stato condotto in triplice replica. Dopo 24 e 48 ore è stata la mortalità/immobilità degli organismi. I risultati sono stati espressi come percentuale di effetto rispetto al controllo.

3.6 Espressione dei risultati di tossicità

I risultati dei saggi ecotossicologici sono espressi come percentuale di effetto rispetto al controllo calcolato con la seguente formula:

$$\text{Effetto (\%)} = (X_k - X_c) / X_k * 100$$

dove per X_k e X_c si intendono rispettivamente il controllo e il campione.

Dove possibile, è stata calcolata la EC₅₀ (Median Effective Concentration) che rappresenta la concentrazione di campione che provoca il 50% di effetto in condizioni standard. Il valore di EC₅₀ è stato espresso in gr_(peso secco) l⁻¹.

3.7 Calcolo di un indice di tossicità integrato

In accordo con Manzo *et al.* (2008) è stato calcolato un indice per la classificazione dei suoli sulla base dei risultati dei test ecotossicologici: il Toxicity test Battery integrated Index (TBI).

L'effetto percentuale (%E) ottenuto per ogni endpoint è stato corretto per ottenere uno Score test Endpoint (SE_i) utilizzando due criteri.

Il primo è la comparazione statistica con il controllo (SCF, Statistical Correction Factor) basata sull'utilizzo del test di student e può assumere i seguenti valori: 0 che corrisponde a nessuna differenza ($p > 0,05$); 1 corrisponde a biostimolazione ($p < 0,05$), 2 ad elevata biostimolazione ($p < 0,01$); 3 a tossicità ($p < 0,05$); 4 corrisponde ad elevata tossicità ($p < 0,01$).

Il secondo criterio è un fattore di correzione legato al "giudizio esperto": la matrice (M) è uguale a 1 per estratti organici del suolo, a 2 per estratti acquosi del suolo, a 3 per il suolo; la severità (S) è uguale a: 1 per la bioluminescenza, 2 per l'allungamento radicale e la crescita corporea, 3 per la crescita algale, 4 per la germinazione e 5 per la riproduzione e la mortalità

La formula del calcolo del SE_i è la seguente:

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

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 percentuale di 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 è il numero di endpoint.

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

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

dove C (Consistenza) = $(N/2 - X)^3$ e X è il numero di endpoint statisticamente non significativi.

Il TBI può essere utilizzato inoltre per definire la seguente scala di rischio ecotossicologico:

Non significativo ($TBI < 5\%$)

Basso ($5\% < TBI < 20\%$ con $C \leq 0$)

Medio ($5\% < TBI < 20\%$ con $C > 0$)

Alto ($20\% < TBI < 50\%$)

Molto alto ($TBI > 50\%$)

L'indice è stato calcolato con i risultati ottenuti dalla batteria di test ecotossicologici su suolo, con quelli ottenuti dalla batteria su estratti acquosi e un indice totale utilizzando i risultati ottenuti da entrambe le matrici. Inoltre sono state effettuate prove di calcolo dell'indice inserendo o eliminando i risultati di alcuni test, per verificare quanto un determinato endpoint potesse influenzare il valore del rischio ecotossicologico e quanto i valori del TBI differissero tra loro in funzione dei test utilizzati.

3.8 Analisi statistica

Le relazioni tra i risultati dei test di tossicità e le concentrazioni dei metalli pesanti, tra i metalli e le caratteristiche chimico fisiche dei suoli ed infine tra gli indici di tossicità e i metalli, sono state effettuate mediante coefficiente di correlazione lineare di Pearson:

$$r = \frac{\sum [(x-M_x) (y-M_y)]}{n \sigma_x \sigma_y}$$

con $-1 \leq r \leq 1$

dove per $r = 1$ si ha il massimo di correlazione diretta, per $r = -1$ si ha il massimo di correlazione inversa, per $r=0$ non si ha correlazione. La correlazione si dice diretta se ai valori crescenti di una variabile corrispondono valori crescenti dell'altra variabile. La correlazione si dice inversa se ai valori crescenti di una variabile corrispondono valori decrescenti dell'altra variabile. Nella formula x e y sono le serie dei dati M_x , M_y sono le medie aritmetiche rispettivamente di x e y , n è il numero totale dei dati, σ_x e σ_y rispettivamente lo scarto quadratico medio delle x e delle y .

Le correlazioni sono state ricavate utilizzando il programma statistico Sigma-Stat 3.5 (Jandel Scientific, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

*4.1 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con *D. magna**

La messa a punto del saggio cronico su suolo con *D. magna* si basa sulle metodica standardizzata del saggio su matrici acquose (OECD, 1998).

Sono state condotte diverse prove per definire le condizioni ottimali per la riproduzione e la sopravvivenza di *D. magna*. Le prove sono state eseguite adoperando diversi pesi totali (30, 40, 50 g), differenti rapporti del suolo con acqua (1:3, 1:4, 1: 5, 1:6), differenti densità di organismi/camera test (1, 3 individui). Tutte le prove sono state eseguite con un suolo standard artificiale OECD (OECD, 1984) e con un'acqua standard per l'allevamento, la quale ha rappresentato anche il controllo negativo (K). La riproduzione e la sopravvivenza negli allevamenti sono state monitorate per confrontarle con i risultati ottenuti dalle prove. Infine è stata eseguita una prova per la definizione di un controllo positivo, che abbia come effetto l'inibizione della riproduzione, testando diverse concentrazioni di $K_2Cr_2O_7$ nel suolo. A seguito di queste prove, è stata descritta la procedura sperimentale scelta per l'esecuzione del saggio, basata sui migliori risultati ottenuti.

Riproduzione negli allevamenti

Gli allevamenti, monitorati per 28 giorni, hanno mostrato una sopravvivenza del 100% e un valore medio di riproduzione di circa 22 neonati/individuo dopo 14 giorni, di 50 neonati/individuo dopo 21 giorni e di 69 neonati/individuo dopo 28 giorni (fig. 4.1). Questi valori sono in accordo con la prova di idoneità dell'allevamento (IRSA-CNR, 1991) che prevede che la riproduzione media di un organismo deve essere di 20-50 neonati/individuo dopo 14 giorni. Il numero di neonati prodotti varia in funzione della disponibilità di cibo e delle condizioni ambientali, può arrivare fino a 30 per ogni stadio adulto, ma più comunemente è compreso tra 6 e 10 (EPA, 2002).

In fig. 4.2 sono rappresentate la riproduzione e la sopravvivenza calcolate come media giornaliera per ogni individuo. Le daphnie negli allevamenti iniziano a riprodursi mediamente dall'ottavo giorno in poi. Il valore di riproduzione giornaliera

più elevato è di 8 neonati/individuo. La sopravvivenza è costante e massima (100%) per tutti e 21 giorni.

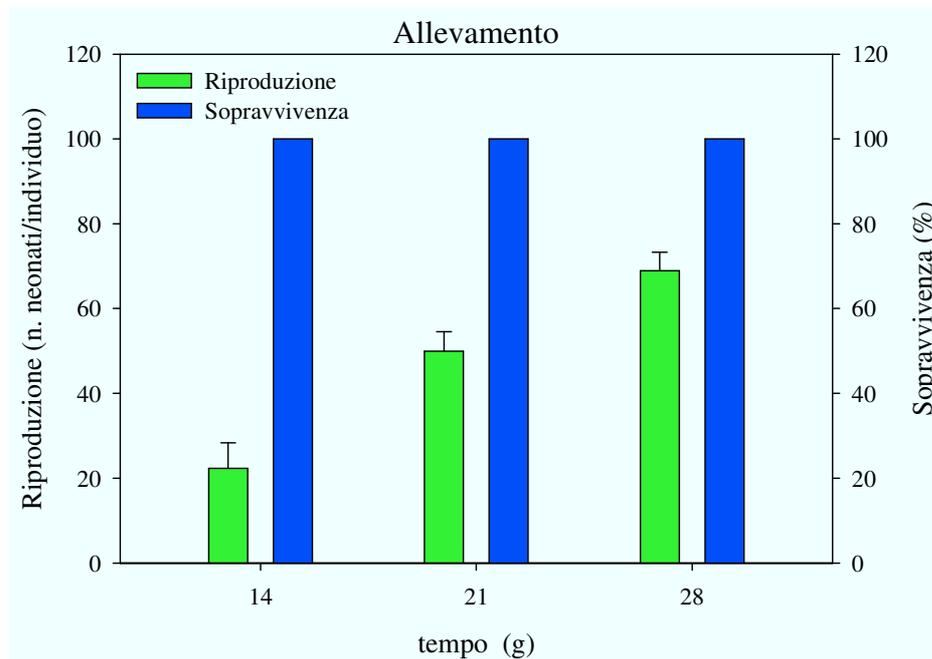


Figura 4.1. Valori medi (\pm e.s.) di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* negli allevamenti.

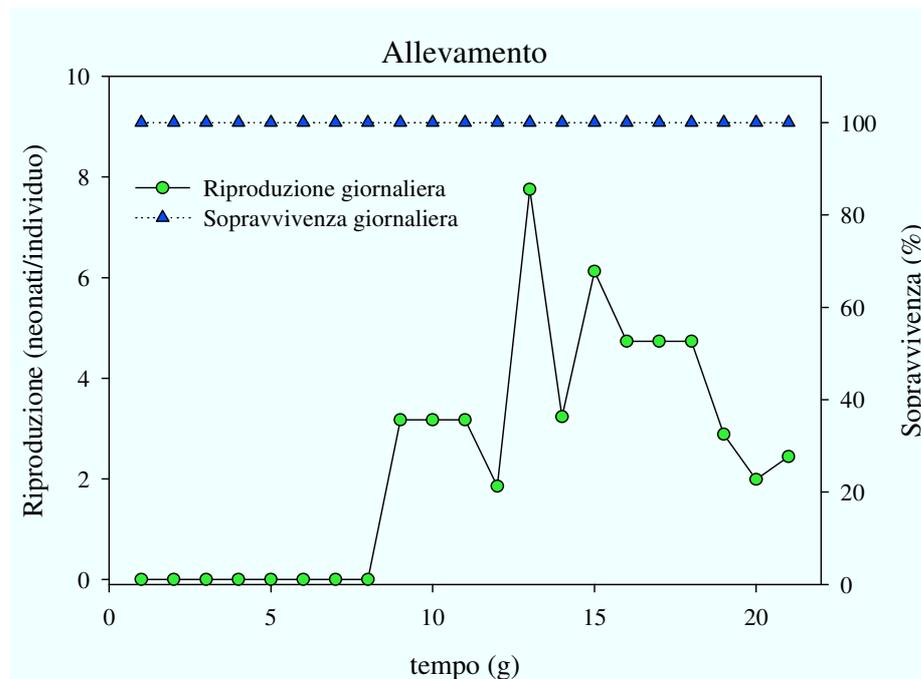


Figura 4.2. Valori medi giornalieri di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* negli allevamenti.

Prima prova: peso totale di 30 g (suolo + acqua), rapporto suolo/acqua di 1:3, densità di 3 individui/camera test.

La sopravvivenza degli organismi sia per il controllo con acqua standard (K) che per il rapporto 1:3 è risultata pari al 100% (fig. 2) per l'intera durata del test (21 gg). Nel K la riproduzione è stata circa 10 volte più elevata (11,5 neonati/individuo) rispetto a 1:3 (1,8 neonati/individuo). Questi valori, molto bassi comparati a quelli dell'allevamento dopo 21 giorni (fig. 4.1), potrebbero essere dovuti al limitato spazio disponibile per ogni organismo. Nella prova successiva, quindi, si è deciso di provare ad aumentare il peso totale della singola camera test e di testare anche rapporti maggiori di suolo/acqua.

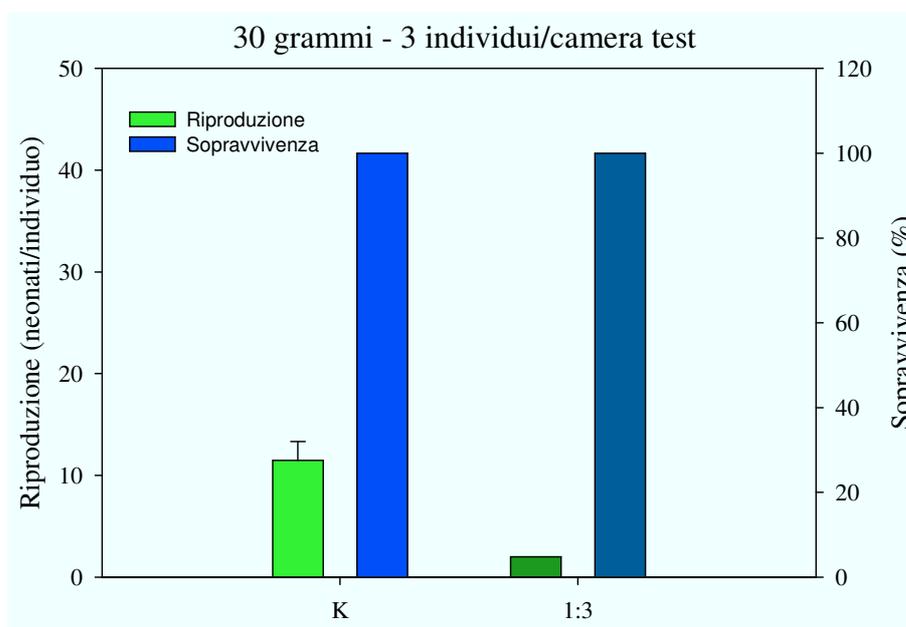


Figura 4.3. Valori medi (\pm e.s.) di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* nella prova con 30 grammi.

Seconda prova: peso totale di 40 g (suolo + acqua), rapporti suolo/acqua di 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, densità di 3 individui/camera test.

La sopravvivenza degli organismi nei vari trattamenti è stata uguale al 100% per tutta la durata del test (fig. 4.4). In questa prova la riproduzione del K varia poco (10 neonati/individuo) rispetto a quella ottenuta con un peso minore (30 g), mentre i diversi rapporti suolo/acqua mostrano un numero di neonati/individuo compreso tra 6,5 per 1:3 e 9,9 per 1:5 (fig. 4.4). I valori di riproduzione sono comunque minori

rispetto a quelli dell'allevamento. In questa prova è stato osservato lo sviluppo di alcuni individui maschi, questo è un'evidente sintomo di stress per la *D. magna*, che in condizioni ambientali normali si riproduce per partenogenesi (Perin, 2004). Quindi sulla base di questa osservazione la prova successiva è stata quella di aumentare ancora il peso totale, ripetendo gli stessi rapporti suolo acqua.

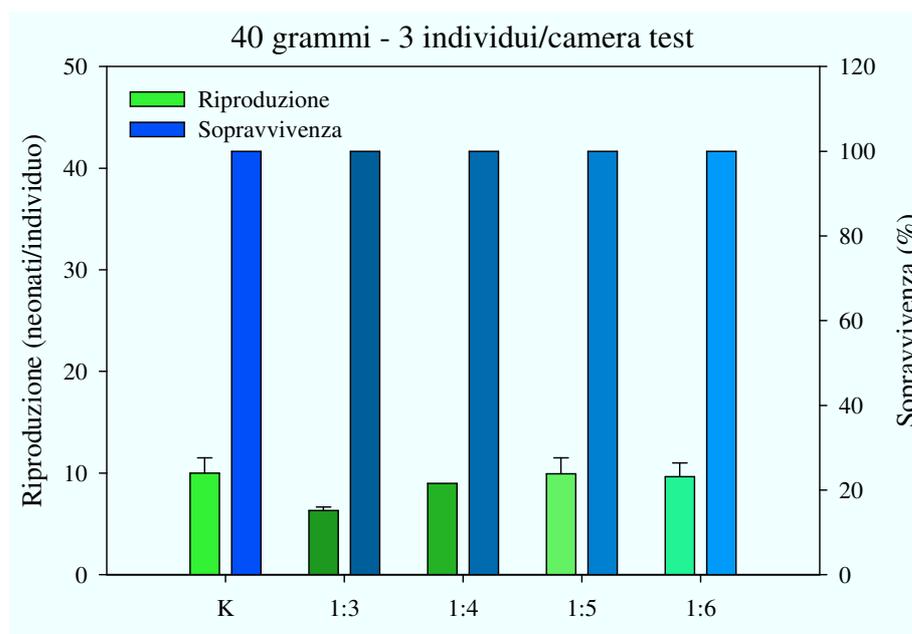


Figura 4.4. Valori medi (\pm e.s.) di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* nella prova con 40 grammi.

Terza prova: peso totale di 50 g (suolo + acqua), rapporti suolo/acqua di 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, densità di 3 individui/camera test.

La sopravvivenza degli organismi nei diversi rapporti suolo/acqua è stata $> 80\%$ (fig. 4.5). La riproduzione ha mostrato un valore nel K di 13,6 neonati/individuo e valori compresi tra 0,9 (1:4) e 2,3 (1:3) per i diversi rapporti suolo/acqua. Comunque i valori di riproduzione nei trattamenti con suolo sono bassi rispetto al K, che a sua volta mostra una riproduzione minore di quella osservata negli allevamenti.

Per queste prove viene mostrato l'andamento giornaliero medio della sopravvivenza e della riproduzione. Nel K gli organismi iniziano a riprodursi l'ottavo giorno (fig. 4.6) come avviene normalmente negli allevamenti, mentre dal quindicesimo giorno fino al termine del test la riproduzione mostra un valore tendente a zero. Con i diversi rapporti suolo/acqua (fig. 4.7), le daphnie hanno iniziato a riprodursi tardi, tra il

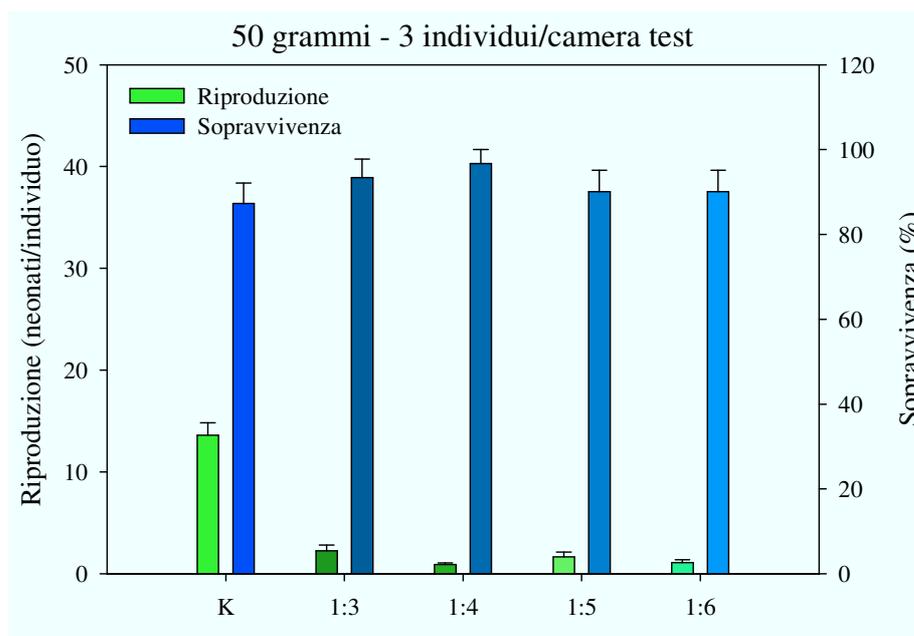


Figura 4.5. Valori medi (\pm e.s.) di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* nella prova con 50 grammi.

decimo (1:6) e il quattordicesimo giorno (1:4), mostrando picchi di riproduzione intorno al quindicesimo giorno. Un aumento della riproduzione è stato notato all'aumentare della mortalità nella singola replica. La riproduzione individuale probabilmente aumenta perché diminuendo la densità di organismi/camera test, con la morte di 1-2 individui, lo spazio e le risorse per i sopravvissuti sono maggiori. Quindi la prova successiva si è concentrata sulla scelta di una minore densità di organismi/camera test. La densità di organismi/camera test indicata dalla procedura standard OECD (OECD, 1998) è di 1 individuo per ogni replica. Inoltre per la prova successiva è stato scelto come rapporto suolo/acqua 1:3 perché oltre ad aver mostrato il valore medio più elevato di neonati/individuo (fig. 4.5) è, tra tutti, il minimo rapporto testato.

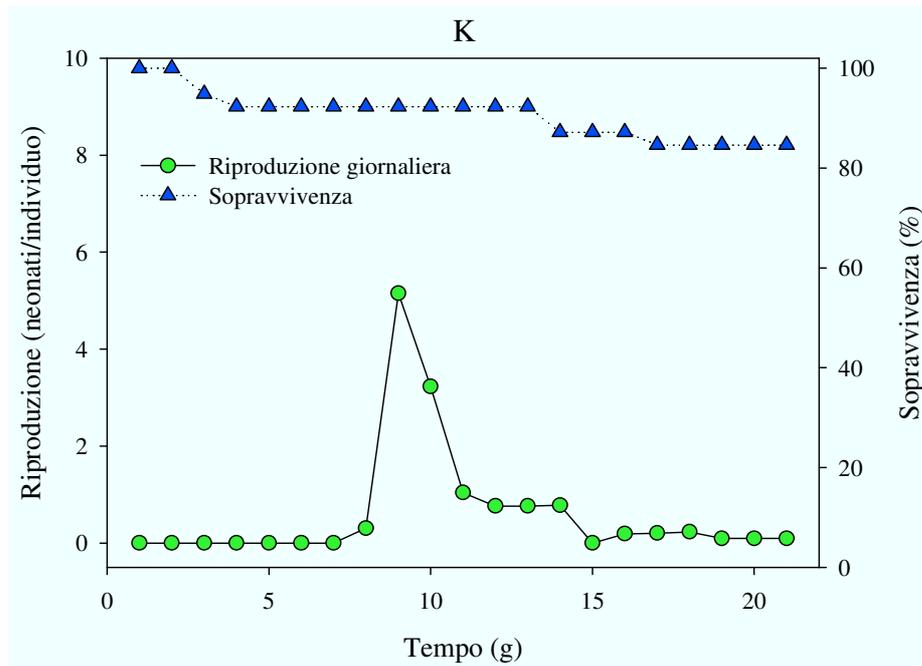


Figura 4.6. Valori medi giornalieri di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* per K con 50 g e 3 individui/camera test.

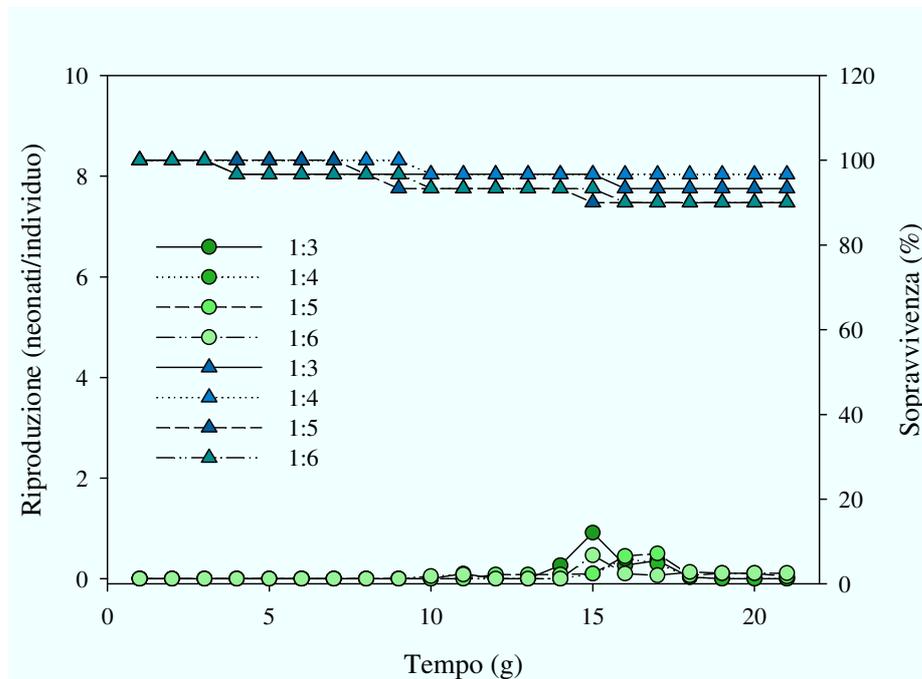


Figura 4.7. Valori medi giornalieri di riproduzione (●) e sopravvivenza (▲) della *D. magna* con 50 g e 3 individui/camera test.

Quarta prova: peso totale di 50 g (suolo + acqua), rapporto suolo/acqua di 1:3, densità di 1 individuo/camera test.

La sopravvivenza media degli organismi in questa prova è stata pari al 100% sia per K che per 1:3 (fig. 4.8). La riproduzione del K, al diminuire della densità di organismi/camera test (da 3 a 1) aumenta notevolmente (da 13,6 a 35 neonati/individuo) avvicinandosi a valori più prossimi a quelli del tasso di riproduzione della *D. magna* negli allevamenti. Il rapporto suolo/acqua 1:3 ha mostrato un valore medio di riproduzione di 14 neonati/individuo, di un ordine di grandezza maggiore della riproduzione ottenuta con 3 organismi/camera test (fig. 4.5). Le differenze tra K e 1:3 sono probabilmente dovute alla presenza della matrice suolo. A questa prova non ne sono succedute altre con pesi maggiori che avrebbero richiesto l'utilizzo di camere test più grandi. Lo scopo della messa a punto di questo saggio è stato inoltre quello di utilizzare minori aliquote del campione e di allestire un test di semplice esecuzione anche dal punto di vista pratico e logistico.

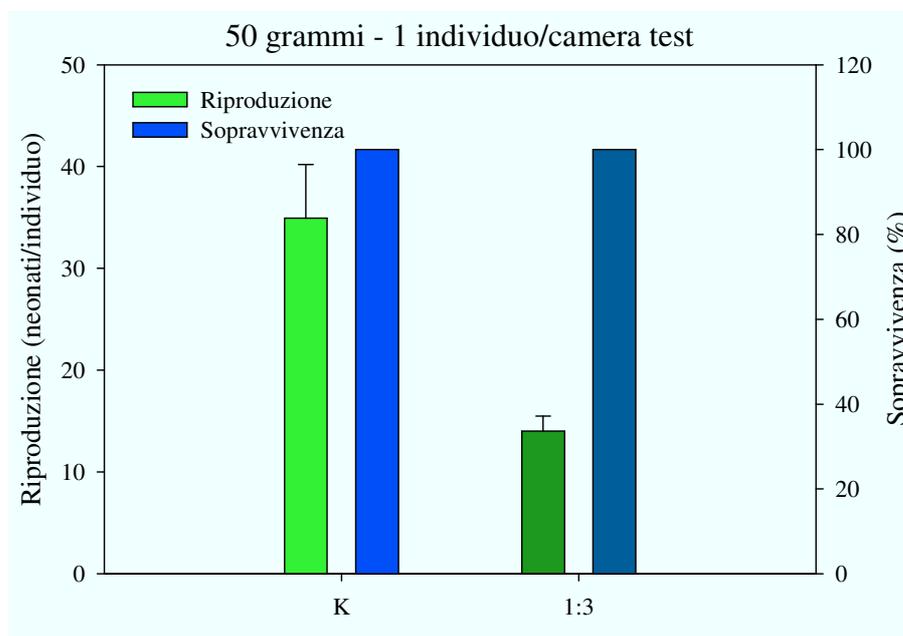


Figura 4.8. Valori medi (\pm e.s.) di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* con 50 grammi e 1 individuo/camera test.

Prove per la definizione di un controllo positivo con OECD + $K_2Cr_2O_7$

La definizione di un controllo positivo è necessaria per accertare la sensibilità del test. Il controllo positivo è un composto chimico di riferimento di cui solitamente

sono noti gli effetti tossici. Per il saggio cronico standard con *D. magna* (OECD, 1998) non è presente un controllo positivo che abbia effetti sulla riproduzione. Per questa prova è stata scelta una sostanza di riferimento utilizzata per il saggio acuto con *D. magna*, ovvero il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$). Le concentrazioni sono state scelte a partire dal range di EC_{50} per il test acuto con *D. magna* (ISO 6431, 1996).

Le prove per la definizione di un controllo positivo sono state effettuate utilizzando un peso totale di 50 grammi, un rapporto suolo/acqua di 1:3 e una densità di 1 organismo/camera test. La riproduzione e sopravvivenza sono state monitorate anche per K. Il controllo K ha mostrato un numero medio di neonati/individuo di circa 65 e una sopravvivenza del 100% (fig. 4.9), questo valore conferma che gli organismi si trovano in buone condizioni ambientali. Le concentrazioni basse e intermedie testate (fig. 4.9) hanno mostrato (escluso $4,6 \text{ mg g}^{-1}$) valori più elevati rispetto al suolo senza bicromato di potassio (1:3). La causa è dovuta ad un probabile rilascio in acqua di potassio, che rappresenta uno degli elementi presenti solitamente nelle acque di allevamento per la daphnia (OECD, 1998; IRSA, 1991). Quindi è plausibile che una maggiore concentrazione di questo nutriente ha stimolato la riproduzione rispetto ad un suolo che è essenzialmente povero di nutrienti. Il suolo OECD è composto principalmente da sabbia (70%), da un media percentuale di argilla (20%) e da un basso contenuto di sostanza organica (10%), rappresentato dalla torba (OECD, 1984). La sopravvivenza nelle concentrazioni medio-basse del $K_2C_2O_7$ (fig. 4.9) è risultata maggiore del 65%, la mortalità è stata registrata mediamente dopo il quattordicesimo giorno dall'inizio del test. Le concentrazioni più elevate di $K_2Cr_2O_7$ ($6,5-9,2 \text{ mg g}^{-1}$) hanno mostrato una riproduzione minore rispetto al suolo senza bicromato (1:3) e in alcuni casi nulla. Per queste concentrazioni la sopravvivenza è risultata <65% e in alcuni casi zero. Dove la mortalità è stata pari al 100%, è stato notato che le daphnie, in tutte le repliche, morivano prima della fine del test. Questo effetto negativo sulla sopravvivenza è da attribuire probabilmente alla maggiore concentrazione del bicromato di potassio. Infatti il cromo solitamente nei suoli tende a legarsi principalmente alla frazione argillosa (Schultz *et al.*, 2004), nel caso del suolo artificiale OECD, la componente argillosa è di natura caolinitica, la quale possiede una minore capacità di legame (Hoffman *et al.*, 2009). Quindi è probabile il cromo, oltre una certa concentrazione, sia più disponibile e quindi provochi i noti effetti negativi sulla sopravvivenza della *D. magna* (Persoone *et al.*, 2009). In

definitiva il bicromato di potassio non si è rivelato un buon controllo positivo. E' probabile che non sia possibile trovare una concentrazione di questa sostanza tale che permetta la sopravvivenza ma non la riproduzione della *D. magna*. In futuro bisognerebbe indagare altri tipi di sostanze.

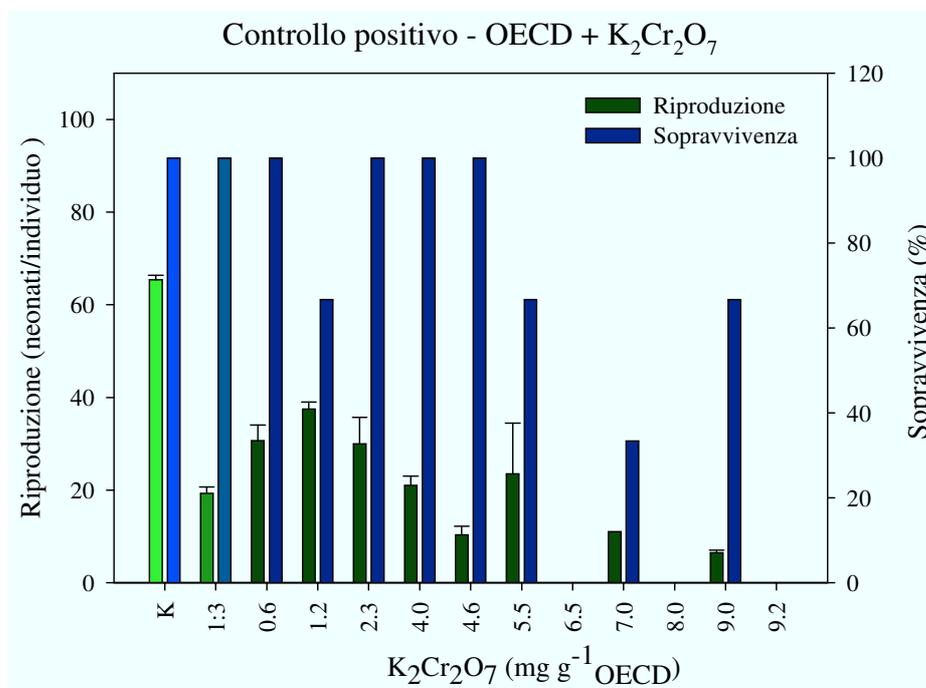


Figura 4.9. Valori medi (\pm e.s.) di riproduzione e sopravvivenza della *D. magna* nella prova con OECD arricchito con $K_2Cr_2O_7$.

4.1.1 Risultato della messa a punto del saggio cronico su suolo con *D. magna*

La procedura selezionata per l'esecuzione del saggio cronico con *D. magna* su suolo è stata il risultato di tutte le prove effettuate per verificare le condizioni ottimali della riproduzione e sopravvivenza del cladocero.

Un giorno prima dell'esecuzione del saggio si procede alla preparazione delle camere test. Si pesa una quantità di suolo (equivalente a peso secco) tale che sia in rapporto 1:3 con acqua standard e tale che il peso totale di suolo + acqua sia di 50 grammi. Si omogeneizza il campione e si pongono tutte le camere test ad una temperatura di $20 \pm 2^\circ C$ e fotoperiodo 16/8 ore luce/buio. Le camere test utilizzate per i vari cambi (5/10 serie di repliche) possono essere coperte con parafilm con piccoli fori, per evitare l'evaporazione dell'acqua, il parafilm deve essere eliminato il giorno prima

del trasferimento delle daphnie, per permettere una sufficiente areazione della camera test.

Il giorno precedente all'esecuzione del saggio inoltre, devono essere separati gli individui adulti (circa 2-4 settimane di età) dall'allevamento, per assicurare la deposizione di giovani con un'età inferiore alle 24 ore.

Il saggio ha una durata di 21 giorni e deve essere eseguito in condizioni controllate di temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e illuminazione (fotoperiodo 16/8 ore - luce/buio).

Per l'esecuzione del test si utilizzano dai 5 ai 10 individui neonati (< 24 ore) per ogni campione (5-10 repliche). Il cibo viene somministrato prima dell'aggiunta degli organismi nelle camere test, e ogni 3-4 giorni contestualmente al rinnovo del mezzo. L'alimentazione è composta da una sospensione di alghe verdi unicellulari (*S. capricornutum*) e da una sospensione di lievito (*S. crevisiae*) entrambe con una concentrazione finale per camera test di $1,5 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} . Viene introdotto un organismo per ogni replica e vengono monitorati la sopravvivenza e la riproduzione preferibilmente tutti i giorni o al massimo a giorni alterni. I neonati nelle repliche vengono contati ed eliminati dalla camera test (minimizzando la perdita d'acqua). Il rinnovo del mezzo (bisettimanale) deve essere effettuato mediante trasferimento degli organismi in un'altra serie di repliche. Alla fine del test viene calcolata la sopravvivenza media percentuale, che deve essere superiore ad un valore di 80% per l'accettabilità del test, e la riproduzione media espressa come numero totale di neonati/individuo.

Questa procedura rimane comunque in fase sperimentale, in quanto non è stato definito un controllo positivo che confermi la validità del test.

*4.2 Prove sperimentali per la messa a punto del saggio cronico su suolo con *S. capricornutum**

La messa a punto del saggio cronico su suolo con *S. capricornutum* è partita prendendo spunto da alcuni riferimenti in bibliografia scientifica (Baun *et al.*, 2002; Aruoja *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2007) e da una delle metodiche standardizzate del saggio con *S. capricornutum* su matrici acquose (EPA, 1994).

Sono state condotte diverse prove per definire le condizioni ottimali per la crescita algale. Le prove sono state eseguite adoperando diversi volumi finali (25 e 10 ml), differenti diluizioni del suolo con acqua (1:4, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100), condizioni statiche o dinamiche delle camere test, e separazione o contatto dell'interfaccia suolo/acqua. Tutte le prove sono state eseguite con un suolo standard artificiale OECD (OECD, 1984) e con un'acqua standard per la crescita algale (EPA, 1994), la quale ha rappresentato anche il controllo negativo (K). Infine è stata eseguita una prova per la definizione di un controllo positivo, che abbia come effetto l'inibizione della crescita algale, testando diverse concentrazioni di $ZnCl_2$ nel suolo. A seguito di queste prove, è stata descritta la procedura sperimentale scelta per l'esecuzione del saggio, basata sui migliori risultati ottenuti.

Prima prova: volume finale di 25 ml, diluizioni del suolo di 1:4 e 1:10, agitazione delle camere test, nessuna separazione dell'interfaccia suolo/acqua

Questa prova ha fatto registrare per il controllo con acqua standard (K) un valore di crescita algale pari a $2,6 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} , mentre per le due diluizioni del suolo (1:4 e 1:10), la crescita algale è stata uguale a zero. Questo risultato è dovuto all'agitazione delle camere test, che provocando la sospensione del suolo, ha inibito la diffusione della luce necessaria per la normale crescita delle alghe.

Per evitare questo problema, in una successiva prova, l'agitazione è stata eliminata, l'interfaccia suolo/acqua è stata separata mediante un filtro di carta e sono state ripetute le stesse diluizioni del suolo.

Seconda prova: volume finale di 25 ml, diluizioni del suolo di 1:4 e 1:10, condizioni statiche del test, separazione dell'interfaccia suolo/acqua mediante un filtro di carta

In questa prova l'utilizzo del filtro, per la separazione dell'interfaccia suolo/acqua, ha permesso la normale crescita algale. I valori di crescita algale per le due diluizioni del suolo (1:4 e 1:10) sono stati rispettivamente di $2,6 \cdot 10^5$ e $3,8 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} (fig.

4.10). Questi sono valori di crescita confrontabili con quello ottenuto dal controllo con acqua (K) di $2,9 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} (fig. 4.10). I limiti principali di questa prova sono stati la mancanza di un contatto diretto tra le alghe e il suolo e la stima reale della crescita algale. La conta delle cellule, infatti, è stata effettuata prelevando il surnatante e, nonostante prima della conta sia stato omogeneizzato con l'aiuto di una micropipetta, una quantità non definita di alghe è rimasta depositata sul filtro. La stima della crescita algale, in questa prova, quindi non corrisponde al valore reale. Per questi motivi, la prova successiva è stata eseguita con lo stesso volume e le stesse diluizioni del suolo ma eliminando il filtro.

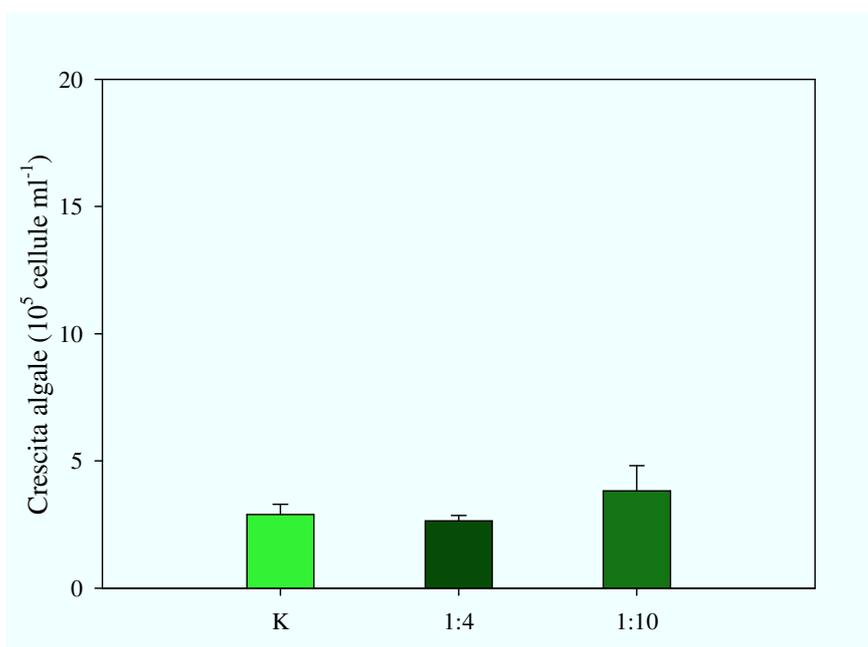


Figura 4.10. Valori medi (\pm e.s.) della crescita algale di *S. capricornutum* con 25 ml, condizioni statiche e con filtro.

Terza prova: volume finale di 25 ml, diluizioni del suolo di 1:4 e 1:10, condizioni statiche del test, nessuna separazione dell'interfaccia suolo/acqua

In questa prova il K ha mostrato una crescita algale di circa $1,5 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} (fig. 2), mentre le diluizioni del suolo 1:4 e 1:10 hanno fatto registrare valori molto più bassi, rispettivamente di $1,5 \cdot 10^4$ e $4 \cdot 10^3$ cellule ml^{-1} (fig. 4.11). Questi valori indicano che le alghe non sono cresciute regolarmente, in quanto il valore di crescita è simile o addirittura minore quello dell'inoculo di partenza (10^4 cellule ml^{-1}). Il passo successivo è stato quello di cambiare il tipo di camera test per condurre la successiva

prova. La camera test utilizzata per questa prova e per le precedenti è una bottigliina di vetro della capacità di circa 100 ml. La scelta, ricaduta sull'utilizzo di piastre Petri (\varnothing 5 cm) con capacità di 10 ml circa, è stata fatta per due motivi: 1) un maggiore rapporto superficie/volume, rispetto a quello della camera test utilizzata per le precedenti prove, avrebbe consentito una migliore diffusione della luce proveniente dall'alto; 2) un recipiente con una minore capacità avrebbe consentito l'utilizzo di minori aliquote del suolo, dell'acqua, delle alghe ecc. Oltre a variare il volume finale, sono state testate diluizioni maggiori del suolo (a partire da 1:10) in quanto la crescita algale ottenuta con 1:4 in tutte le prove è stata molto bassa e differente dal valore ottenuto nel controllo (K).

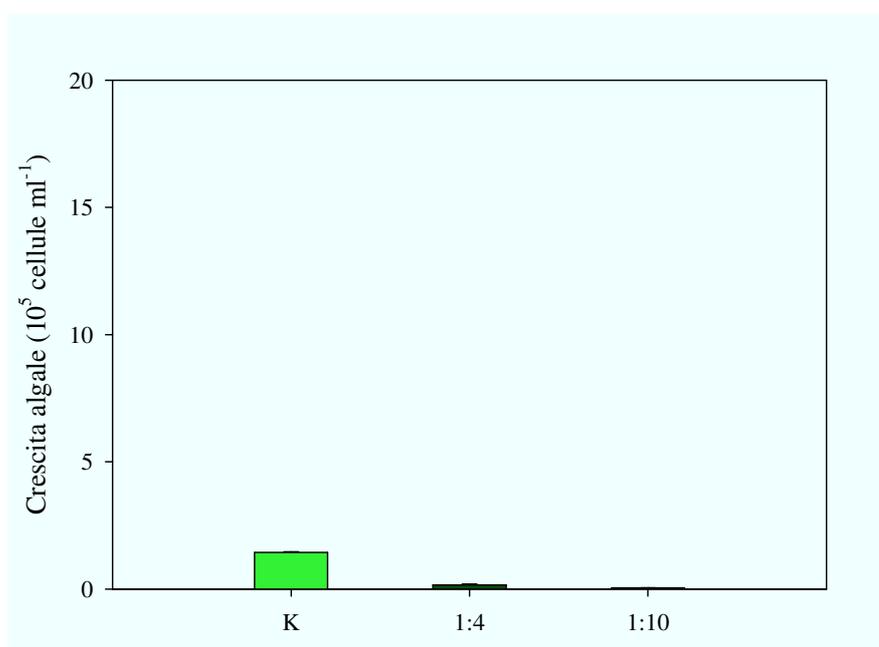


Figura 4.11. Valori medi (\pm e.s.) della crescita algale di *S. capricornutum* nella prova con 25 ml, condizioni statiche e senza filtro.

Quarta prova: volume finale di 10 ml, diluizioni del suolo di 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, condizioni statiche, nessuna separazione dell'interfaccia suolo/acqua

In questa prova il K ha mostrato una crescita algale di $14,5 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} (fig. 4.12), notevolmente maggiore rispetto a tutte le prove effettuate con la camera test da 25 ml, questo valore conferma che la scelta di cambiare la camera test è stata adeguata. Le diluizioni 1:10 e 1:25 hanno dato valori simili (rispettivamente $4,1 \cdot 10^5$ e $3,9 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1}), ma comunque molto inferiori al controllo K (fig. 4.12). La

diluizione 1:50 ha fatto registrare una crescita di $6,6 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} che è circa la metà di quella osservata per K (fig. 4.12). Tra tutte le diluizioni testate, 1:100 è quella che ha mostrato la più elevata crescita algale ($13,9 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1}) e il valore più simile al controllo (fig. 4.12). Un fattore importante, per ottenere risultati precisi, deve essere anche la conta delle cellule algali al microscopio. Infatti, nonostante i campioni prima della conta vengano centrifugati per eliminare le particelle di suolo più pesanti, in quelli più concentrati rimangono comunque svariate particelle fini in sospensione, che rendono la conta molto più lenta, difficoltosa e meno accurata. La diluizione 1:100, oltre a mostrare il migliore risultato di crescita algale, si è rivelata la migliore in assoluto anche nella conta delle cellule algali al microscopio. Per questi motivi è stata scelta per condurre le prove per la definizione del controllo positivo.

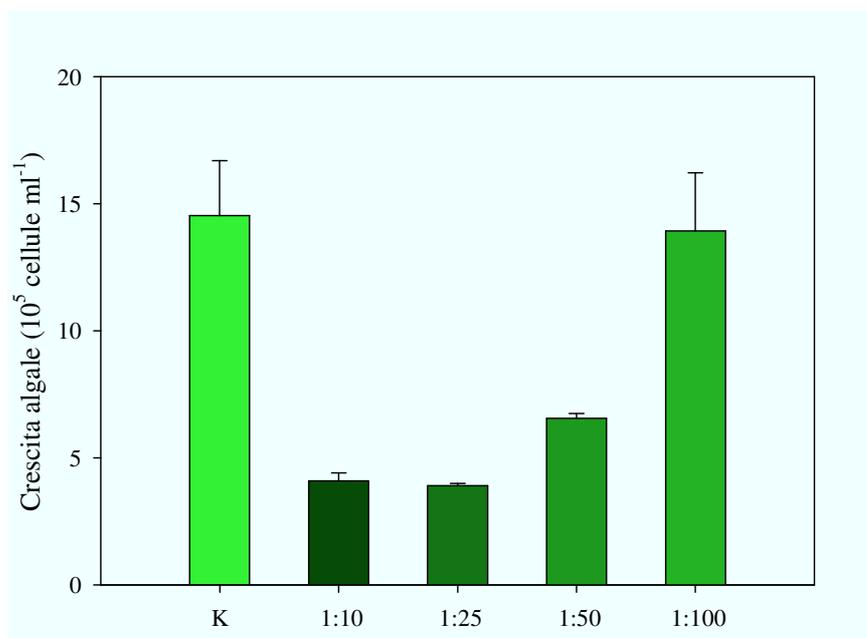


Figura 4.12. Valori medi (\pm e.s.) della crescita algale di *S. capricornutum* nella prova con 10 ml, condizioni statiche e senza filtro.

Prove per la definizione di un controllo positivo con ZnCl_2

Le prove per la definizione di un controllo positivo sono state effettuate utilizzando un volume finale di 10 ml, una diluizione suolo/acqua di 1:100, condizioni statiche del test e nessuna separazione dell'interfaccia suolo/acqua. La sostanza chimica di riferimento è stata il cloruro di zinco, scelta a partire da uno studio in cui, è stato

evidenziato che la crescita algale viene inibita all'aumentare della concentrazione di questo composto nel suolo (Aruoja *et al.*, 2004).

I risultati di crescita algale ottenuti dalle prove condotte per la definizione di un controllo positivo sono riassunti in figura 4.13. I due controlli OECD e K, con e senza suolo, hanno mostrato una crescita algale rispettivamente di $4,6 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} e di $7,5 \cdot 10^5$ cellule ml^{-1} . Confrontando i risultati ottenuti dalle differenti concentrazioni di ZnCl_2 con quelli ottenuti dal controllo OECD, è possibile notare che le concentrazioni più basse fino a $0,63 \text{ mg l}^{-1}$ hanno provocato un aumento della crescita algale rispetto al controllo OECD.

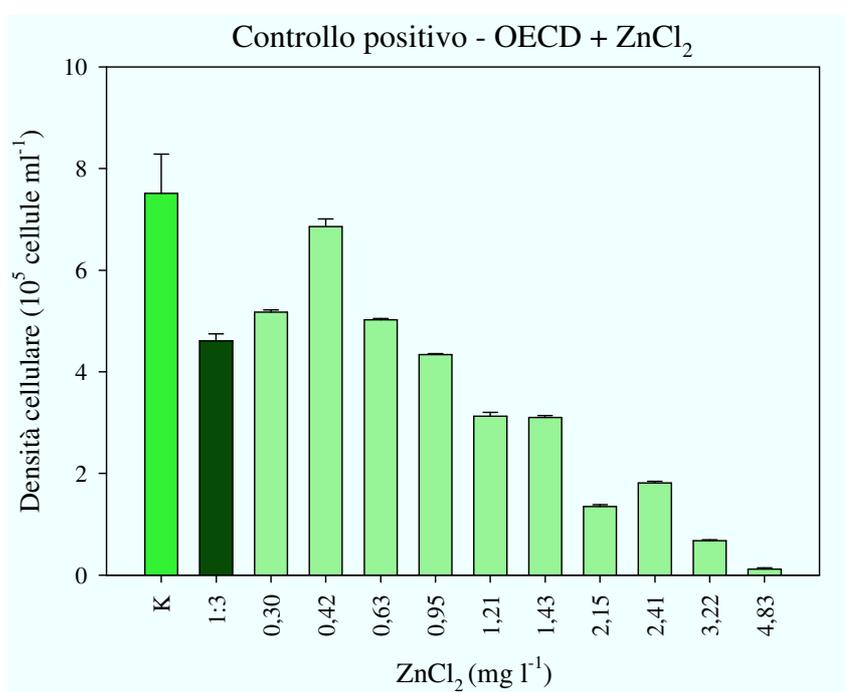


Figura 4.13. Valori medi (\pm e.s.) della crescita algale di *S. capricornutum* con differenti concentrazioni di ZnCl_2 .

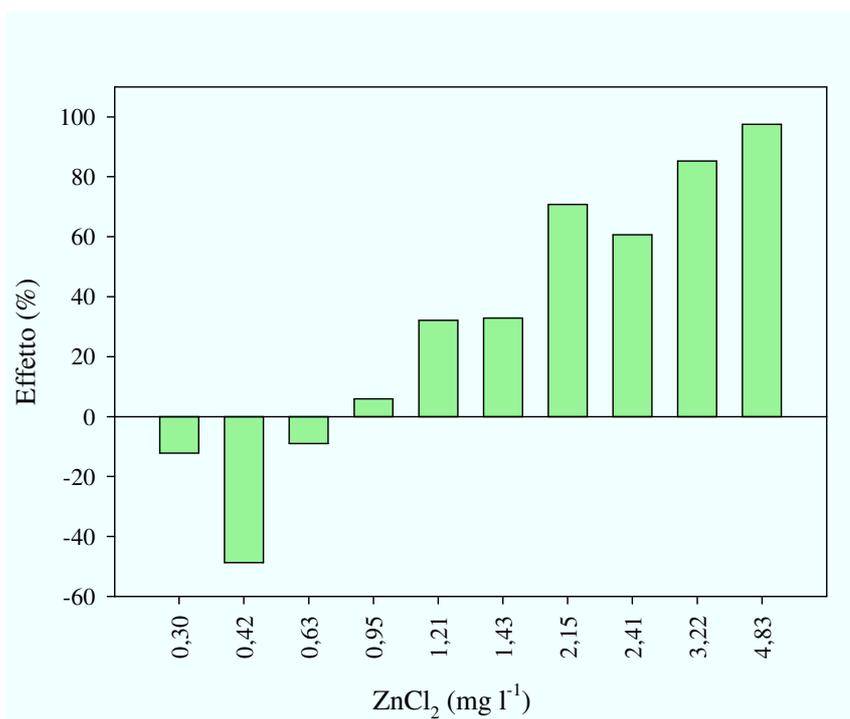


Figura 4.14. Effetti sulla crescita algale delle differenti concentrazioni di ZnCl₂ rispetto al controllo OECD (1:3).

L'effetto di stimolazione della crescita algale (fig. 4.14) per le concentrazioni inferiori di cloruro di zinco, potrebbe essere una manifestazione di ormesi, un fenomeno di effetto positivo ottenuto con bassi livelli di alcuni composti chimici, che è stato dimostrato per molti organismi e composti chimici differenti (Calabrese e Baldwin, 2001). A partire dalla concentrazione 0,95 mg l⁻¹, invece, si osserva una graduale diminuzione della crescita algale rispetto al controllo OECD (fig. 4.14). La crescita algale infatti è stata inibita quasi totalmente (97% effetto) con una concentrazione di ZnCl₂ di 4,83 mg l⁻¹. Lo ZnCl₂ quindi è un buon candidato di controllo positivo per questo saggio. Per il momento la sua definizione è ancora sperimentale. In futuro il test con le stesse concentrazioni dovrà essere ripetuto per confermare i risultati ottenuti in questa prova.

4.2.1 Risultato della messa a punto del saggio cronico su suolo con *S. capricornutum*

La procedura selezionata per l'esecuzione del saggio cronico con *S. capricornutum* su suolo è stata il risultato di tutte le prove effettuate per verificare le condizioni ottimali della crescita algale.

La procedura prevede la preparazione dell'inoculo algale un giorno prima dell'esecuzione del test. L'inoculo deve essere prelevato da una coltura algale axenica in fase di crescita esponenziale, successivamente viene centrifugato (2000 rpm, 5 min) e, dopo aver aspirato il surnatante, le cellule vengono risospese con NaHCO_3 (15 mg l^{-1}). L'inoculo viene messo in incubazione per 24 ore a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio. In una piastra Petri (\varnothing 5 cm) viene pesata una quantità di suolo equivalente a 0,1 g di peso secco a cui vengono aggiunti 9,9 ml di acqua standard per la crescita algale (EPA, 1994). Per ogni replica si aggiunge un volume dell'inoculo algale tale che la densità cellulare in ogni piastra sia di 10^4 cellule ml^{-1} . Le piastre vengono incubate per 96 ore ad una temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, in condizioni statiche. Al termine del test, i campioni vengono centrifugati (300 rpm, 10 min) per eliminare le particelle di suolo più pesanti che possono interferire con la lettura al microscopio. Le cellule algali possono essere contate con l'ausilio di una camera di Burker. Il saggio deve essere condotto preferibilmente su 5 repliche per ogni campione.

4.3. Valutazione ecotossicologica dei suoli oggetto di studio

La seconda fase della ricerca ha riguardato l'applicazione di una batteria ecotossicologica a quattro suoli (ACT, MIA, TAN e SSV) campionati a settembre 2008 e ad aprile 2009. Questa fase ha avuto come obiettivo principale la valutazione della tossicità dei suoli oggetto di studio. Inoltre è stato valutato il rischio ecotossicologico mediante il calcolo di un indice di tossicità integrato, che tiene conto delle diverse matrici adoperate e dei differenti organismi test. Al fine di verificare l'influenza dell'integrazione nella batteria del nuovo saggio cronico su suolo con *S. capricornutum*, l'indice è stato calcolato integrando o meno i risultati di questo test.

4.3.1 Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli

I suoli, campionati nel 2008 e nel 2009, sono stati caratterizzati per: pH, capacità idrica massimale (CIM), tenore idrico (TI), contenuto di sostanza organica (SO), contenuto di carbonio (C) e azoto (N), tessitura, contenuto totale di otto metalli (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn), contenuto dei metalli nella frazione disponibile e nell'estratto acquoso del suolo.

I suoli hanno mostrato valori di pH (tab. 4.1) compresi tra 6,19 e 7,05 da debolmente acido a neutro. I suoli MIA e SSV sono quelli con un maggiore contenuto di sostanza organica, capacità idrica massimale e tenore idrico. Infatti la sostanza organica, ha una notevole capacità di trattenere acqua, e influenza notevolmente anche la capacità idrica massimale dei suoli. MIA in particolare ha un contenuto di SO di circa tre volte maggiore rispetto al suolo ACT, dove si misurano i valori più bassi di questo parametro. Il contenuto più elevato di sostanza organica, carbonio e azoto de suoli MIA e SSV, potrebbe essere dovuto al fatto che provengono da due boschi e presentano una copertura vegetale fitta e una maggiore quantità di lettiera. Questi parametri risultano invece minori per i suoli ACT e TAN, probabilmente perché nelle due aiuole viene eseguita una rimozione periodica della lettiera ed è presente una minore copertura vegetale. Tutti i tenori idrici nel 2009 sono risultano maggiori (eccetto per ACT) rispetto a quelli osservati nel 2008 (tab. 4.1). Il motivo di queste differenze è imputabile al periodo di campionamento. Nel 2008 i suoli sono stati raccolti a settembre alla fine della stagione estiva, mentre nel 2009 i suoli sono stati prelevati ad aprile, all'inizio della primavera e dopo un lungo periodo di precipitazioni.

Tabella 4.1. Valori medi (\pm e. s.) dei parametri chimico-fisici dei suoli

ANNO	CAMPIONI	pH	CIM (%)	TI (%)	SO (%)	N (%)	C (%)
2008	ACT	6.51 (0.09)	65.26 (2.67)	19.79 (0.05)	8.50 (0.58)	0.44 (0.05)	2.79 (0.08)
	MIA	7.05 (0.02)	129.83 (3.84)	28.66 (0.04)	22.50 (0.26)	1.15 (0.01)	11.70 (0.25)
	TAN	6.94 (0.06)	73.55 (1.90)	25.54 (0.07)	9.50 (0.26)	1.02 (0.05)	3.63 (0.08)
	SSV	6.19 (0.01)	106.8 (2.14)	28.30 (0.34)	21.50 (0.45)	1.26 (0.09)	8.32 (0.56)
2009	ACT	6.67 (0.03)	51.20 (1.81)	19.55 (0.17)	8.00 (0.00)	0.91 (0.16)	2.13 (0.05)
	MIA	6.77 (0.04)	108.27 (0.78)	42.21 (0.22)	25.00 (0.58)	1.46 (0.43)	13.17 (0.37)
	TAN	6.21 (0.05)	34.85 (0.69)	40.15 (0.66)	11.33 (0.67)	0.63 (0.04)	3.44 (0.04)
	SSV	6.66 (0.03)	117.99 (3.56)	59.88 (0.51)	23.67 (0.67)	1.51 (0.43)	10.48 (2.59)

I suoli ACT e TAN sono franco-sabbiosi, MIA è franco-limoso e SSV è argilloso (tab. 4.2). La maggiore percentuale di sabbia per ACT e TAN spiega anche il minore contenuto d'acqua, infatti i suoli sabbiosi drenano più velocemente l'acqua ed hanno una bassa capacità di trattenerla.

Tabella 4.2. Percentuali di sabbia, limo e argilla e classi tessiturali dei suoli oggetto di studio

Campioni	ACT	MIA	TAN	SSV
SABBIA (%)	60	31	54	24
LIMO (%)	36	58	43	31
ARGILLA (%)	4	11	3	45
Classi Tessiturali (criterio USDA)	FRANCO SABBIOSA	FRANCO LIMOSA	FRANCO SABBIOSA	ARGILLOSA

Metalli

Tra i suoli indagati, SSV ha mostrato il maggior contenuto totale dei metalli in entrambi i periodi di campionamento (tabelle 4.3 e 4.4).

La concentrazione totale di Cu risulta maggiore nel suolo MIA in entrambi gli anni. In particolare in questo suolo si osserva un aumento della concentrazione di Cu nel 2009 di circa il doppio rispetto a quella misurata nell'anno precedente, mentre negli altri suoli Cu non varia significativamente.

Il contenuto totale di Pb presenta la maggiore concentrazione nel suolo MIA (tabelle 4.3 e 4.4), ma in generale risulta abbastanza elevato in tutti i suoli, sia nel 2008 (142,40 - 238,60 $\mu\text{g g}^{-1}$ p. s.) che nel 2009 (111,92 - 226,23 $\mu\text{g g}^{-1}$ p. s.).

Le elevate concentrazioni di Pb in ACT, MIA e TAN potrebbero essere dovute dalla vicinanza con strade ad elevato traffico veicolare (Ramakrishnaiah e Somasheka, 2002). La concentrazione di Pb a SSV, potrebbe essere dovuta dalla composizione della roccia madre. Un'ulteriore spiegazione potrebbe essere anche la differente destinazione d'uso di questo suolo in anni passati. Infatti SSV (oasi del WWF dal 1993) ai tempi dei Borboni fino al 1922 è stata riserva di caccia, quindi è molto probabile che il piombo utilizzato per i pallini dei fucili si possa essere accumulato nel suolo col tempo.

Il contenuto totale di Zn è maggiore nel suolo MIA in entrambi gli anni (tabelle 4.3 e 4.4), e in generale presenta livelli elevati in tutti i suoli. Si osserva una forte diminuzione della concentrazione totale di Zn dal 2008 (0,81 - 1,76 mg g^{-1} p. s.) al 2009 (0,11-0,18 mg g^{-1} p. s.), in particolare nel suolo MIA il contenuto di Zn si riduce di circa 10 volte.

I livelli più elevati del contenuto totale di metalli si riscontrano nei suoli SSV (contenuto totale) e MIA (contenuto di alcuni metalli) probabilmente perché sono quelli che presentano la maggiore percentuale di sostanza organica (tab. 4.1), di limo o argilla (tab. 4.2). Infatti sostanza organica e argilla possono trattenere i metalli nelle parti più superficiali del suolo evitando che questi possano essere lisciviati (Feng *et al.*, 2007).

Tabella 4.3. Valori medi (\pm e.s) del contenuto totale (TOT),del contenuto nella frazione disponibile (DIS) e nell'estratto acquoso (EA) dei metalli nei suoli campionati nel 2008

Metalli		ACT	MIA	TAN	SSV
Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	0,09 (0,02 10^{-1})	0,16 (0,05 10^{-1})	0,06 (0,01)	0,25 (0,01)
	DIS	0,03 (0,01 10^{-1})	0,05 (0,01 10^{-1})	0,02 (0,03 10^{-1})	0,01 (0,04 10^{-2})
	EA	0,02 10^{-3} (0,02 10^{-3})	0,01 10^{-2} (0,02 10^{-2})	0,0 (0,00)	0,03 10^{-3} (0,03 10^{-3})
Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	4,12 (0,19)	3,55 (0,54)	1,87 (0,19)	5,61 (0,13)
	DIS	0,04 10^{-1} (0,03 10^{-1})	0,03 10^{-1} (0,01 10^{-2})	0,02 10^{-1} (0,04 10^{-2})	0,01 (0,05 10^{-2})
	EA	0,09 10^{-2} (0,08 10^{-3})	0,07 10^{-2} (0,05 10^{-3})	0,04 10^{-2} (0,04 10^{-3})	0,02 10^{-1} (0,02 10^{-2})
Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	57,70 (4,08)	149,22 (19,84)	17,31 (0,62)	18,13 (0,06)
	DIS	22,27 (0,52)	53,23 (1,43)	3,75 (0,21)	6,42 (0,35)
	EA	0,14 (0,01 10^{-1})	0,31 (0,03 10^{-1})	0,06 (0,01 10^{-1})	0,04 (0,04 10^{-1})
Fe (mg g^{-1} p.s.)	TOT	22,56 (0,61)	21,92 (0,30)	21,74 (0,53)	29,53 (1,04)
	DIS	0,03 (0,01)	0,10 (0,01)	0,03 (0,01)	0,10 (0,01)
	EA	0,03 10^{-1} (0,04 10^{-3})	0,02 10^{-1} (0,04 10^{-3})	0,02 10^{-1} (0,07 10^{-3})	0,10 (0,01 10^{-1})
Mn (mg g^{-1} p.s.)	TOT	0,92 (0,04)	0,81 (0,03)	0,92 (0,01)	1,05 (0,05)
	DIS	0,04 (0,02 10^{-1})	0,05 (0,02)	0,02 (0,001)	0,26 (0,01)
	EA	0,02 10^{-2} (0,02 10^{-3})	0,01 10^{-2} (0,01 10^{-3})	0,01 10^{-2} (0,05 10^{-4})	0,01 10^{-1} (0,02 10^{-3})
Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	2,74 (0,04)	2,71 (0,04)	0,72 (0,02)	3,65 (0,11)
	DIS	0,06 (0,02 10^{-1})	0,14 (0,01)	0,04 (0,02 10^{-1})	0,11 (0,05 10^{-1})
	EA	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	195,30 (4,00)	238,60 (26,27)	142,40 (7,47)	189,47 (2,05)
	DIS	28,45 (0,83)	32,63 (0,15)	26,91 (2,03)	90,43 (7,38)
	EA	0,02 (0,002)	0,01 (0,07 10^{-2})	0,05 10^{-1} (0,03 10^{-2})	0,04 10^{-1} (0,01 10^{-1})
Zn (mg g^{-1} p.s.)	TOT	0,87 (0,22)	1,76 (0,57)	0,97 (0,15)	0,81 (0,13)
	DIS	0,08 (0,04 10^{-1})	0,11 (0,01)	0,09 (0,01)	0,06 (0,01)
	EA	0,03 10^{-2} (0,05 10^{-3})	0,02 10^{-2} (0,03 10^{-3})	0,04 10^{-2} (0,02 10^{-3})	0,05 10^{-2} (0,09 10^{-3})
Σ (mg g^{-1} p.s.)	TOT	24,61	24,88	23,79	31,61
	DIS	0,20	0,34	0,17	0,52
	EA	0,03 10^{-1}	0,03 10^{-1}	0,03 10^{-1}	0,10

Tabella 4.4. Valori medi (\pm e.s) del contenuto totale (TOT), nella frazione disponibile (DIS) e nell'estratto acquoso (EA) dei metalli nei suoli campionati nel 2009

Metalli		ACT	MIA	TAN	SSV
Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	0,06 (0,01 10^{-1})	0,11 (0,03 10^{-1})	0,05 (0,04 10^{-1})	0,17 (0,02)
	DIS	0,02 (0,01 10^{-2})	0,04 (0,06 10^{-2})	0,03 10^{-1} (0,02 10^{-1})	0,06 (0,08 10^{-2})
	EA	0,03 10^{-4} (0,02 ⁴)	0,07 10^{-3} (0,01 10^{-3})	0,05 10^{-3} (0,05 10^{-4})	0,01 10^{-2} (0,04 10^{-3})
Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	6,30 (0,22)	4,83 (0,30)	3,34 (0,18)	7,82 (0,17)
	DIS	0,01 10^{-1} (0,01 10^{-2})	0,01 10^{-1} (0,01 10^{-3})	0,07 10^{-1} (0,05 10^{-2})	0,01 10^{-1} (0,03 10^{-3})
	EA	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,02 10^{-1} (0,02 10^{-3})
Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	67,36 (5,18)	357,05 (16,66)	21,06 (0,88)	20,39 (0,57)
	DIS	10,60 (0,56)	51,47 (4,37)	8,81 (0,29)	2,23 (0,02)
	EA	0,09 (0,01 10^{-1})	0,43 (0,03 10^{-1})	0,10 (0,02 10^{-1})	0,06 (0,09 10^{-1})
Fe (mg g^{-1} p.s.)	TOT	25,26 (0,64)	24,56 (1,02)	22,74 (0,89)	31,70 (1,01)
	DIS	0,03 (0,06 10^{-2})	0,08 (0,04 10^{-1})	0,16 (0,07 10^{-1})	0,06 (0,02 10^{-1})
	EA	0,02 10^{-2} (0,02 10^{-3})	0,07 10^{-2} (0,03 10^{-3})	0,05 10^{-2} (0,01 10^{-3})	0,08 10^{-1} (0,03 10^{-3})
Mn (mg g^{-1} p.s.)	TOT	0,85 (0,04 10^{-1})	0,71 (0,08 10^{-1})	0,77 (0,05 10^{-1})	1,16 (0,01)
	DIS	0,07 10^{-1} (0,03 10^{-3})	0,02 (0,01 10^{-1})	0,04 (0,02 10^{-1})	0,09 (0,03 10^{-1})
	EA	0,04 10^{-4} (0,04 10^{-4})	0,01 10^{-3} (0,05 10^{-4})	0,09 10^{-4} (0,09 10^{-4})	0,08 10^{-3} (0,02 10^{-3})
Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	1,83 (0,02)	1,65 (0,06)	0,81 (0,09)	2,17 (0,03)
	DIS	0,02 (0,09 10^{-2})	0,09 (0,01)	0,04 (0,02 10^{-1})	0,04 (0,09 10^{-2})
	EA	0,07 10^{-2} (0,02 10^{-2})	0,01 10^{-1} (0,01 10^{-2})	0,07 10^{-2} (0,01 10^{-2})	0,09 10^{-2} (0,01 10^{-2})
Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	TOT	188,99 (16,07)	226,23 (10,28)	111,97 (1,14)	n.d. 29,09
	DIS	10,99 (0,50)	29,21 (1,29)	28,25 (0,54)	29,09 (1,24)
	EA	0,03 10^{-1} (0,03 10^{-2})	0,01 (0,06 10^{-3})	0,02 10^{-2} (0,01 10^{-2})	0,02 (0,06 10^{-2})
Zn (mg g^{-1} p.s.)	TOT	0,17 (0,04 10^{-1})	0,18 (0,04 10^{-1})	0,12 (0,03 10^{-1})	0,11 (0,02 10^{-1})
	DIS	0,01 (0,01 10^{-2})	0,04 (0,06 10^{-2})	0,02 (0,01 10^{-2})	0,01 (0,03 10^{-2})
	EA	0,08 10^{-4} (0,08 10^{-4})	0,00 (0,00)	0,01 10^{-2} (0,07 10^{-4})	0,06 10^{-3} (0,04 10^{-3})
Σ (mg g^{-1} p.s.)	TOT	26,57	26,12	23,80	33,03
	DIS	0,07	0,22	0,26	0,19
	EA	0,03 10^{-2}	0,06 10^{-2}	0,08 10^{-2}	0,07 10^{-2}

n.d. non determinato

I suoli che hanno presentato un maggiore contenuto di metalli nella frazione disponibile e nell'estratto acquoso del suolo (tabelle 4.3 e 4.4) sono stati SSV nel 2008 e TAN nel 2009.

In particolare il suolo con un contenuto di Cu maggiore nella frazione disponibile è stato in entrambi gli anni MIA. In questo suolo la concentrazione di Cu nella frazione disponibile risulta essere molto più elevata di quella degli altri suoli. Il contenuto di Pb nella frazione disponibile risulta maggiore in SSV nel 2008 e in MIA nel 2009, ma le differenze più marcate con gli altri suoli si osservano nel 2008 (26,91 - 90,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ p. s.). La concentrazione di Zn nella frazione disponibile risulta più elevata in TAN nel 2008 e in MIA nel 2009.

La concentrazione dei metalli nella frazione disponibile dei suoli, escluso TAN, è diminuita nel 2009 rispetto all'anno precedente. Questo potrebbe essere dovuto alle forti piogge invernali che hanno preceduto il prelievo di suoli nel 2009, è probabile che i metalli nella frazione disponibile del suolo siano stati lisciviati negli strati inferiori.

Infine i livelli dei metalli nell'estratto acquoso del suolo sono molto bassi in entrambi gli anni. In particolare: Cu è più elevato in MIA sia per il 2008 che per il 2009; Pb è maggiore in ACT nel 2008 e in SSV nel 2009; Zn nel 2008 è più elevato in SSV e nel 2009 in TAN.

In conclusione i suoli sembrano essere contaminati in particolare da Cu, Pb e Zn. Infatti le concentrazioni di questi tre metalli superano nella maggior parte casi i limiti di legge previsti dal D. M. 471/1999 per i suoli ad uso verde pubblico, privato e residenziale (tab. 4.5).

Tabella 4.5. Valori limite previsti dalla legge D. M. 471/99 in relazione al contenuto totale di Cu, Pb e Zn nei suoli. In rosso i valori che superano il limite di legge.

Anno	Campione	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)
2008	ACT	57,70	195,30	870
	MIA	149,22	238,60	1760
	TAN	17,31	142,40	970
	SSV	18,31	189,47	810
2009	ACT	67,36	188,99	170
	MIA	357,06	226,23	180
	TAN	21,06	111,97	120
	SSV	20,39	n.d.	110
D.M. 471/99 ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)		120	100	150

Le concentrazioni dei metalli indagati sono confermate anche da precedenti studi effettuati nell'area urbana di Napoli (Imperato *et al.*, 2003) e i livelli dei metalli sono confrontabili a quelli rilevati nei suoli urbani da altri studi (Mielke *et al.*, 2001; Madrid *et al.*, 2002; Salvagio Manta *et al.*, 2002). La contaminazione di questi tre metalli molto probabilmente è di origine antropica. Gli elevati livelli di Cu, Zn e Pb sono dovuti principalmente alle emissioni degli autoveicoli (Imperato *et al.*, 2003). Nonostante la benzina senza piombo sia stata vietata da qualche anno questo metallo è stato trovato ancora in concentrazioni superiori ai limiti di legge (D. M. 471/1999) nei suoli ACT, MIA e TAN che si trovano in prossimità di strade molto trafficate. Queste elevate concentrazioni probabilmente sono dovute anche alla elevata persistenza di Pb nei suoli (Irha *et al.*, 2009).

L'elevato contenuto di Cu, Zn e Pb nel suolo SSV invece è da attribuire alla composizione della roccia madre, i livelli di Pb inoltre potrebbero essere dovuti anche ad una contaminazione storica per la differente destinazione d'uso di questo suolo.

Relazioni tra le caratteristiche dei suoli e i metalli

Per verificare eventuali relazioni tra il contenuto di metalli e i parametri chimico-fisici del suolo, è stata calcolata una correlazione mediante il coefficiente lineare di Pearson. Le correlazioni sono state calcolate considerando per ogni parametro entrambi i risultati del 2008 e del 2009.

Le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli analizzate, non hanno mostrato correlazioni statisticamente significative con nessuno dei metalli indagati, probabilmente perché il confronto è stato effettuato sulla disponibilità di una serie limitata di dati.

4.3.2 Risultati della batteria di test ecotossicologici su suolo

La batteria di saggi ecotossicologici selezionata e applicata ai suoli campionati è composta da:

- Test acuto in fase solida con il batterio *Vibrio fischeri*;
- Test cronico di contatto con l'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum*;
- Test acuto e cronico di fitotossicità con una monocotiledone (*Sorghum saccharatum*) e due dicotiledoni (*Lepidium sativum* e *Sinapis alba*);
- Test acuto e cronico con l'ostracode *Heterocypris incongruens*;
- Test acuto e cronico con il lombrico *Eisenia veneta*.

I primi quattro test sono stati condotti sui campioni di suolo in entrambe le stagioni, il test con il lombrico è stato utilizzato sui suoli nell'anno 2009. In questa batteria è stato incluso anche il saggio cronico su suolo con *S. capricornutum*.

V. fischeri

I risultati del saggio con *V. fischeri*, condotto con differenti concentrazioni dei suoli, hanno reso possibile il calcolo dell'EC₅₀, ovvero la concentrazione alla quale è stato ottenuto il 50% di inibizione della bioluminescenza rispetto ad un controllo. I valori di EC₅₀ calcolati dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione ai campioni di suolo sono riassunti in figura 4.15. In generale si osserva una diminuzione dei valori di EC₅₀ dal 2008 al 2009 (fig. 4.15). Tutti i suoli, quindi, nel 2009 presentano una maggiore tossicità verso *V. fischeri* rispetto all'anno precedente. I valori di EC₅₀ più bassi sono stati ottenuti con il suolo SSV sia nel 2008 che nel 2009. Il suolo TAN ha mostrato i valori più elevati di EC₅₀, sia nel 2008 che nel 2009 (fig. 4.15). SSV, tra i quattro suoli, sembra essere quello con la maggiore tossicità per *V. fischeri*, dovuta probabilmente alla maggiore concentrazione totale dei metalli in questo suolo (Leitgib *et al.*, 2007; Coz *et al.*, 2008). I suoli MIA e TAN mostrano una forte diminuzione dei valori di EC₅₀ nel 2009, infatti il 50% di effetto viene raggiunto con una concentrazione di suolo circa tre volte più bassa di quella del 2008. TAN tra i quattro suoli risulta in generale il meno tossico.

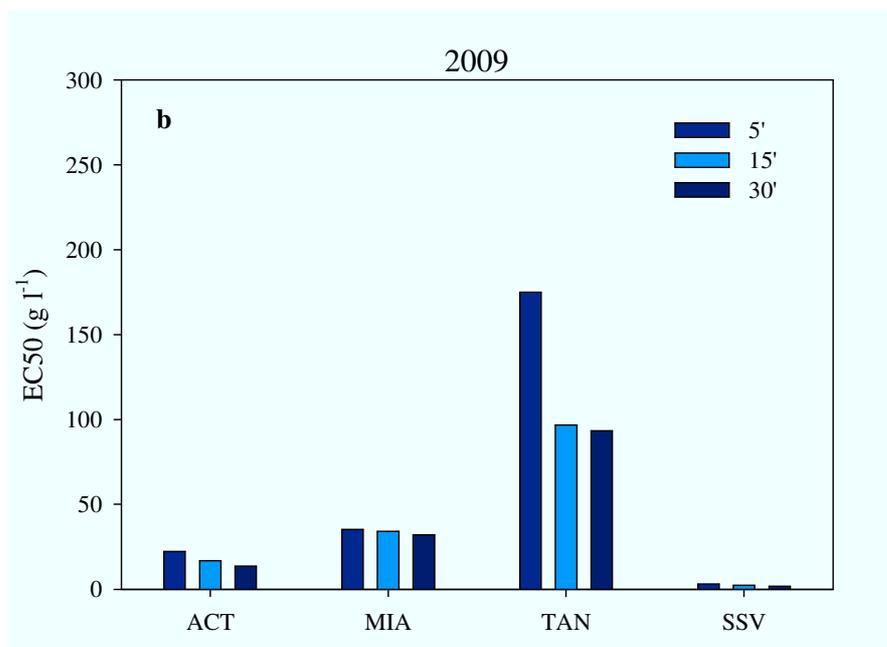
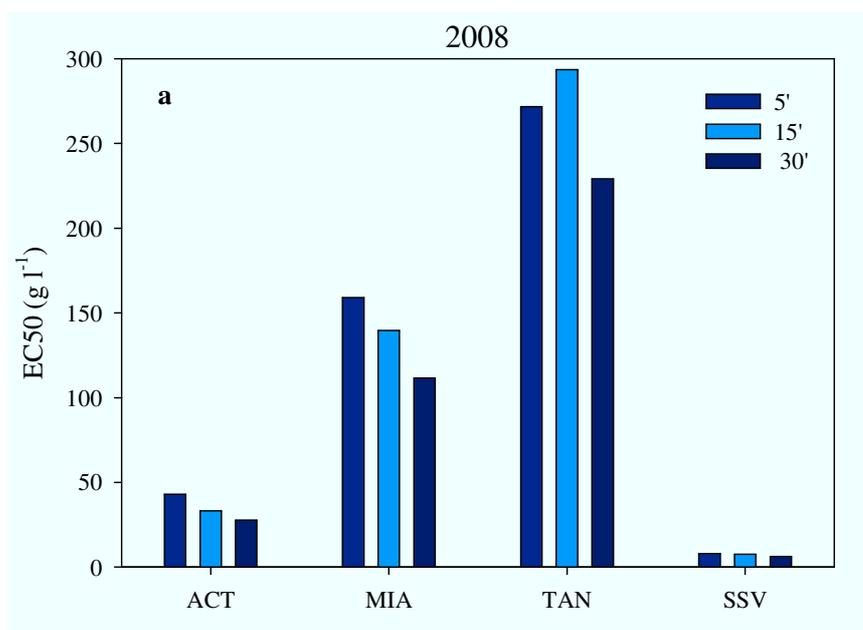


Figura 4.15 (a-b). Valori di EC₅₀ per *V. fischeri* dopo 5, 15, e 30 minuti di esposizione ai suoli oggetto di studio.

S. capricornutum

Il saggio sperimentale con *S. capricornutum* è stato condotto utilizzando una concentrazione di suolo di 10 g l⁻¹ (sospensione 1%). In grafico (4.16) sono riportati gli effetti dei suoli sulla crescita algale rispetto ad un controllo. In generale gli effetti nel 2008 sono minori rispetto a quelli nel 2009. Per i suoli ACT e MIA si osserva

una biostimolazione della crescita algale in entrambi gli anni. Per TAN si manifestano effetti di inibizione della crescita algale in tutti e due gli anni, mentre per SSV una biostimolazione nel 2008 e un'inibizione della crescita algale nel 2009. Un altro studio, che ha utilizzato il saggio *S. capricornutum* su una sospensione di suolo, ha ottenuto effetti di biostimolazione della crescita algale in suoli con le minori concentrazioni di Zn, Pb e Cd, ed effetti di inibizione della crescita a concentrazioni più elevate di questi metalli (Aruoja *et al.*, 2004). La biostimolazione è comunque un segnale di effetto negativo, perché può evidenziare la presenza di sostanze che agiscono da nutrienti per le alghe, provocando una crescita eccessiva rispetto al controllo (Blaise e Vasseur, 2005).

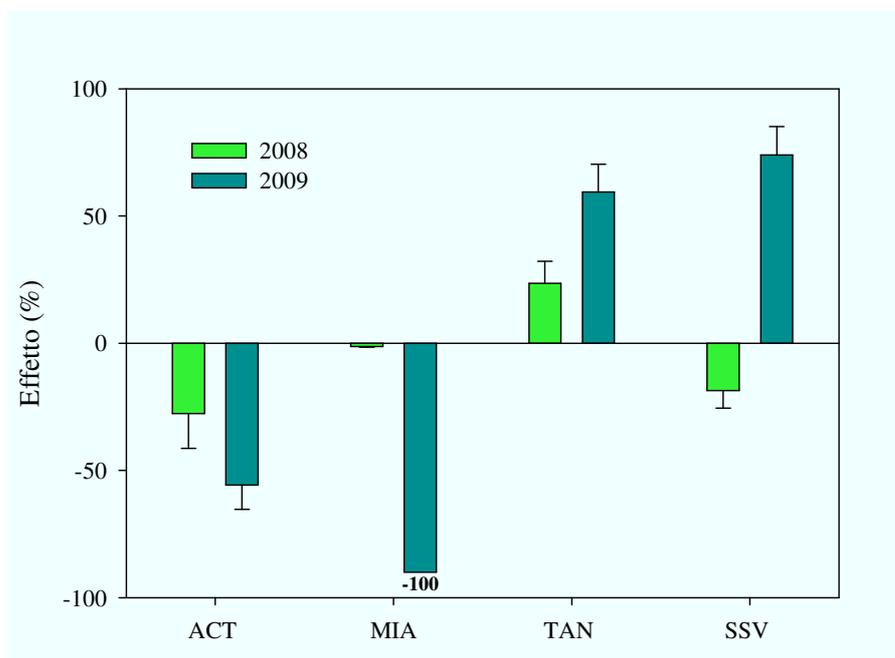


Figura 4.16 Effetto (\pm e.s) dei suoli sulla crescita algale di *S. capricornutum* rispetto al controllo.

Piante

Il saggio con le piante è stato condotto sulla matrice suolo tal quale con tre differenti specie: *S. saccharatum*, *S. alba* e *L. sativum*. Gli effetti sono stati valutati confrontando l'indice di germinazione del suolo rispetto al controllo. L'indice di germinazione tiene conto di due endpoint: la geminazione dei semi e l'allungamento radicale. Nel 2008 (fig. 4.17a), tutti i suoli hanno biostimolato *S. alba* e *L. sativum*, con valori molto elevati per la prima ($>100\%$). Tutti i suoli hanno mostrato lievi effetti di inibizione ($<20\%$) con *S. saccharatum*. Nel 2009 (fig. 4.17b) tutti i suoli

mostrano effetti di biostimolazione con *L. sativum* (fig. 4.17 b) con il valore più elevato per il suolo ACT (-50%). Il suolo MIA ha fatto registrare gli effetti più elevati con *S. sacharatum* (inibizione del 34 %) e con *S. alba* (biostimolazione del 66%). Nel 2008 gli effetti sulle tre piante non mostrano marcate differenze tra i suoli, mentre nel 2009 MIA sembra essere il suolo che ha mostrato i maggiori effetti tossici, probabilmente dovuti all'elevata concentrazione di Cu. Molti autori riportano gli effetti dei metalli sulle piante, tali effetti variano a seconda del metallo considerato, della concentrazione nel suolo e/o estratto acquoso e della specie di pianta utilizzata (Arambašić *et al.*, 1995; An, 2004; Shultz *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Le risposte molto diverse, oltre alle differenze tra le specie di piante utilizzate, potrebbero essere dovute alla combinazione delle proprietà chimico-fisiche dei suoli con le concentrazioni dei metalli. Infatti diversi parametri (pH, sostanza organica, argilla, contenuto d'acqua, capacità di scambio cationico, ecc.) possono influenzare la disponibilità dei metalli nel suolo (Kamnev e van der Lelie, 2000). In questo studio sembra che le specie *S. alba* e *L. sativum* siano più sensibili agli effetti tossici dei contaminanti del suolo nonostante evidenzino effetti di biostimolazione. La biostimolazione potrebbe essere dovuta alle interazioni dei metalli presenti nel suolo. Fargašová (2001) riporta che Cu e Ni hanno un forte effetto antagonista e in combinazione tra loro stimolano la crescita delle radici di *S. alba* rispetto al controllo.

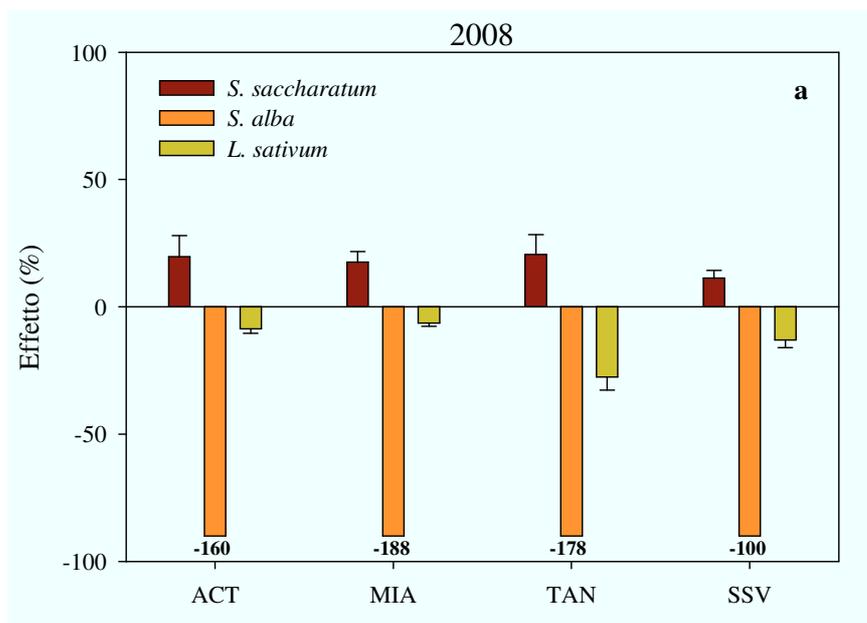


Figura 4.17 (a). Effetto (\pm e.s) dei suoli sulla germinazione e allungamento radicale delle tre piante rispetto al controllo.

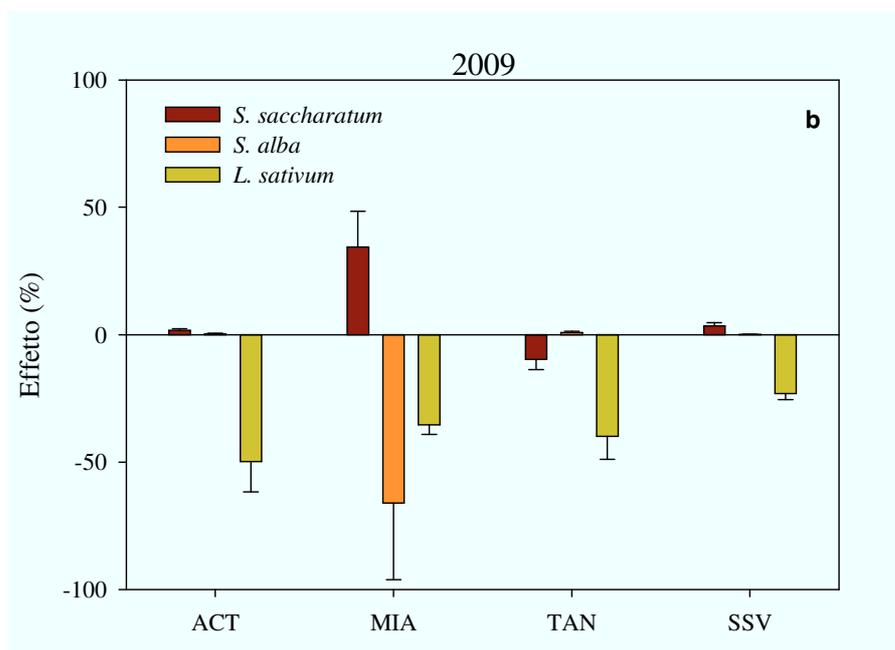


Figura 4.17 (a-b). Effetto (\pm e.s) dei suoli sulla germinazione e allungamento radicale delle tre piante rispetto al controllo.

H. incongruens

Il saggio con *H. incongruens* è stato condotto utilizzando una sospensione del suolo pari al 4% (400 mg di suolo e 4 ml di acqua surnatante). Gli effetti dei suoli sulla sopravvivenza e sulla crescita di *H. incongruens*, rispetto ad un controllo, sono rappresentati in figura 4.18 (a-b). Nel 2008 (fig. 4.18a) gli effetti dei suoli sia sulla sopravvivenza che sulla crescita dell'ostracode sono stati molto bassi (<15%), solo SSV ha mostrato un effetto moderato di biostimolazione della crescita (-37%) rispetto al controllo. Nel 2009 (fig. 4.18b), ACT e MIA mostrano un'inibizione della sopravvivenza dell'ostracode del 45%. Gli effetti sulla crescita corporea sono di inibizione per i suoli ACT (42%) e MIA (17%), e di biostimolazione per TAN(51%) e SSV (29%).

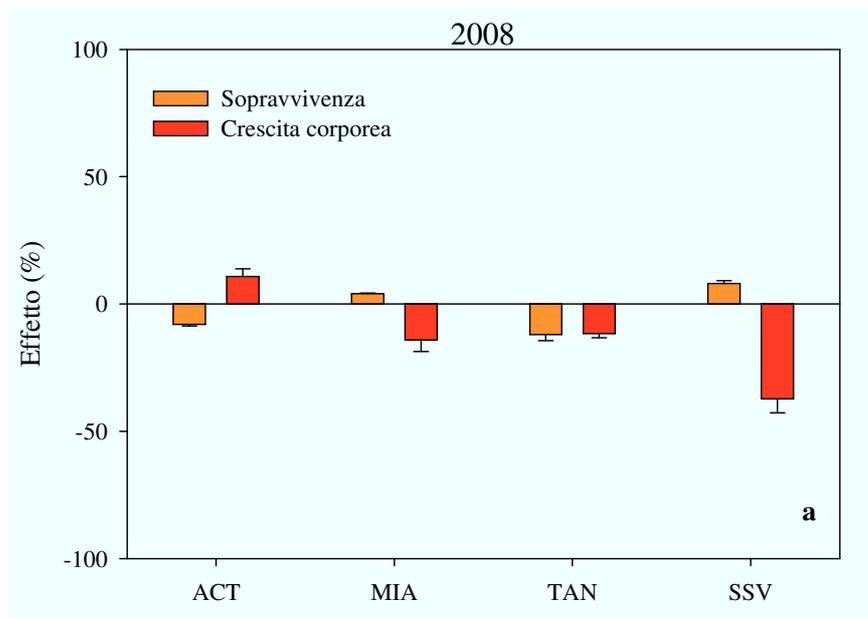


Figura 4.18 (a). Effetto (\pm e.s) dei suoli sulla sopravvivenza e sulla crescita di *H. incongruens* rispetto al controllo

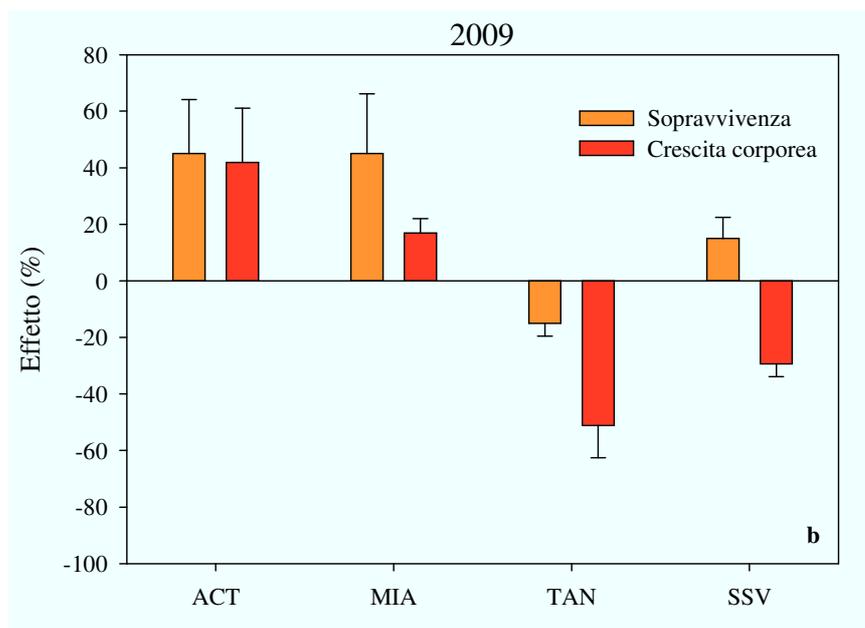


Figura 4.18 (b). Effetto (\pm e.s) dei suoli sulla sopravvivenza e sulla crescita di *H. incongruens* rispetto al controllo

La crescita dell'ostracode potrebbe essere stata influenzata dalle concentrazioni dei metalli. Effetti di inibizione della crescita (40%) sono stati riscontrati in suoli con livelli Pb, Zn e Cu (Hamdi *et al.*, 2007) inferiori rispetto a quelli dei suoli oggetto di questo studio. Inoltre gli effetti negativi sulla sopravvivenza potrebbero essere dovuti anche a contaminanti non indagati come gli idrocarburi (Hubálek *et al.*, 2007).

E. veneta

Il saggio con *E. veneta* è stato condotto sulla matrice tal quale del suolo. Gli effetti dei suoli sulla sopravvivenza e sulla crescita del lombrico *E. veneta* sono rappresentati in figura 4.19. Tutti i suoli non hanno mostrato effetti sulla sopravvivenza del lombrico. Gli unici effetti sulla crescita sono stati riscontrati per MIA (17%) e TAN (24%).

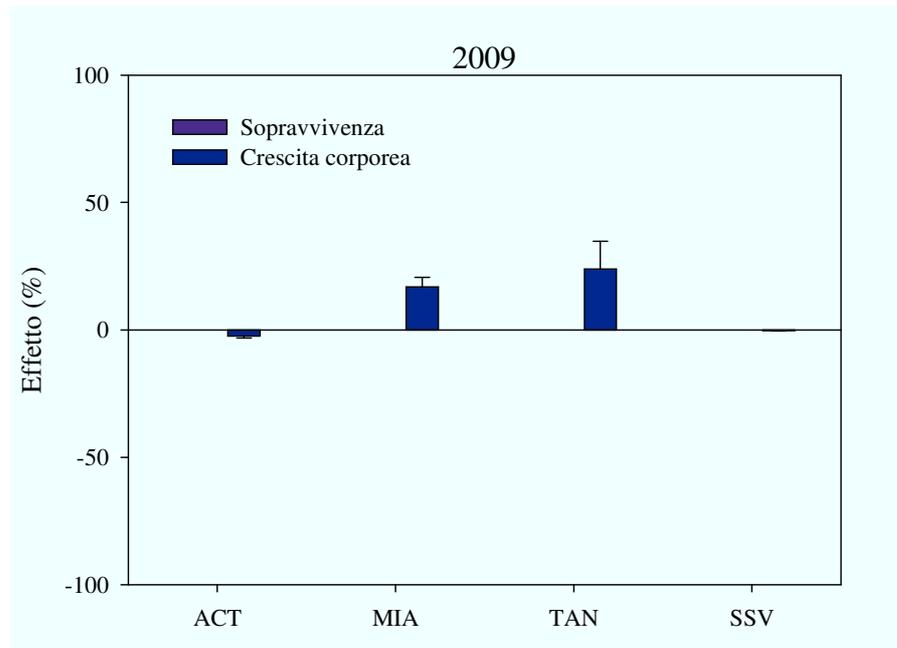


Figura 4.19. Effetto (\pm e.s.) dei suoli sulla sopravvivenza e sulla crescita di *E.veneta* rispetto al controllo

E. veneta non si è rivelato molto sensibile, questo è in contrasto con i livelli dei metalli misurati nei suoli. Altri studi infatti hanno dimostrato la sensibilità dei lombrichi ai metalli (Spurgeon *et al.* 2000; Nahmani *et al.*, 2007).

4.3.3 Risultati della batteria di test ecotossicologici su estratto acquoso del suolo

La batteria di saggi ecotossicologici selezionata e applicata agli estratti acquosi dei suoli campionati è composta da:

- Test acuto con il batterio *Vibrio fischeri*;
- Test cronico con l'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum*;
- Test acuto con il cladocero *Daphnia magna*.

V. fischeri

I risultati del saggio con *V. fischeri* condotto con differenti diluizioni degli estratti acquosi del suolo hanno reso possibile il calcolo dell'EC₅₀ solo per SSV in entrambi gli anni, e per TAN nel 2009 (tab.4.6).

Tabella 4.6. Valori di EC₅₀ (g l⁻¹) calcolati dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione ai campioni di suolo

	2008			2009		
	5'	15'	30'	5'	15'	30'
ACT	-	-	-	-	-	-
MIA	-	-	-	-	-	-
TAN	-	-	-	279,8	280,8	155
SSV	29,35	25,15	17,82	25,56	29	16,24

Per confrontare i risultati di tutti i suoli quindi, sono stati rappresentati gli effetti ottenuti con *V. fischeri*, dopo 30 minuti di esposizione alla stessa concentrazione (~100 g l⁻¹) degli estratti acquosi dei suoli (fig. 4.20). Nel 2008 gli effetti maggiori sono stati ottenuti con TAN e SSV, mentre nel 2009 con MIA e SSV. In generale gli effetti più evidenti sono stati mostrati dall'estratto acquoso di SSV, che sembra essere il più tossico per *V. fischeri*. Questi risultati potrebbero essere dovuti alla maggiore concentrazione dei metalli nell'estratto acquoso del suolo SSV nel 2008 e nel suolo TAN nel 2009 (Tchounwou e Reed, 2000).

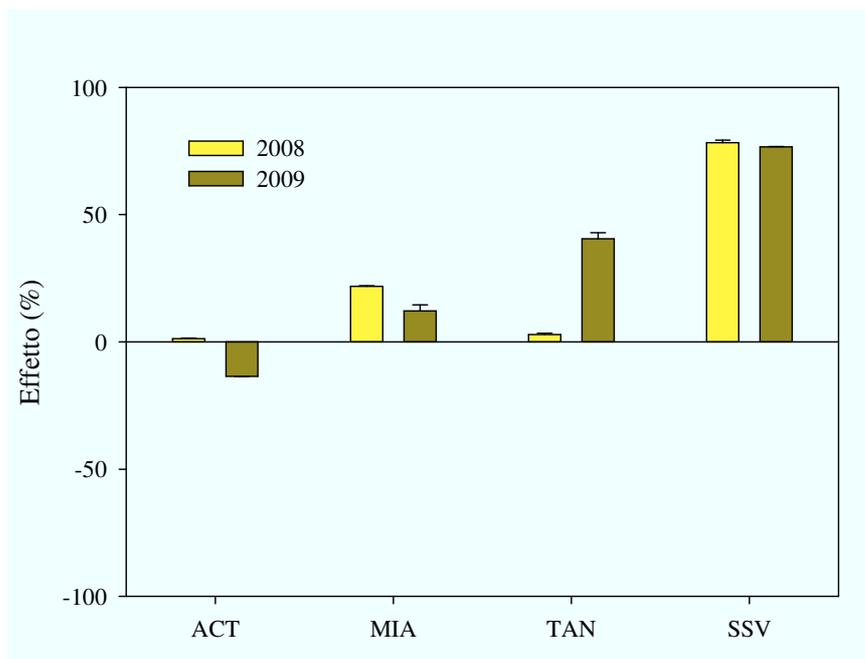


Figura 4.20. Effetto (\pm e.s.) degli estratti acquosi del suolo sulla bioluminescenza di *V. fischeri*.

S. capricornutum

I risultati del saggio con *S. capricornutum*, condotto su differenti diluizioni degli estratti acquosi del suolo, non hanno reso possibile il calcolo dell' EC_{50} . Per confrontare i risultati sono stati rappresentati gli effetti ottenuti alla stessa concentrazione (15 g l^{-1}) degli estratti acquosi dei suoli. Gli effetti ottenuti dai suoli nel 2009 sono più elevati rispetto a quelli del 2008 (fig. 4.21). In particolare si osservano effetti di biostimolazione della crescita algale alti per MIA nel 2008, e molto alti per ACT, MIA e TAN nel 2009. SSV è il suolo che ha mostrato il maggiore effetto di inibizione della crescita algale nel 2009. Questi effetti così marcati di biostimolazione potrebbero essere dovuti al rilascio negli estratti acquosi di metalli, che contribuiscono alla crescita algale anche in basse concentrazioni. Fe, Mn, Zn e Cu infatti vengono utilizzati come micronutrienti per preparare la soluzione standard per la coltura algale (EPA, 1994).

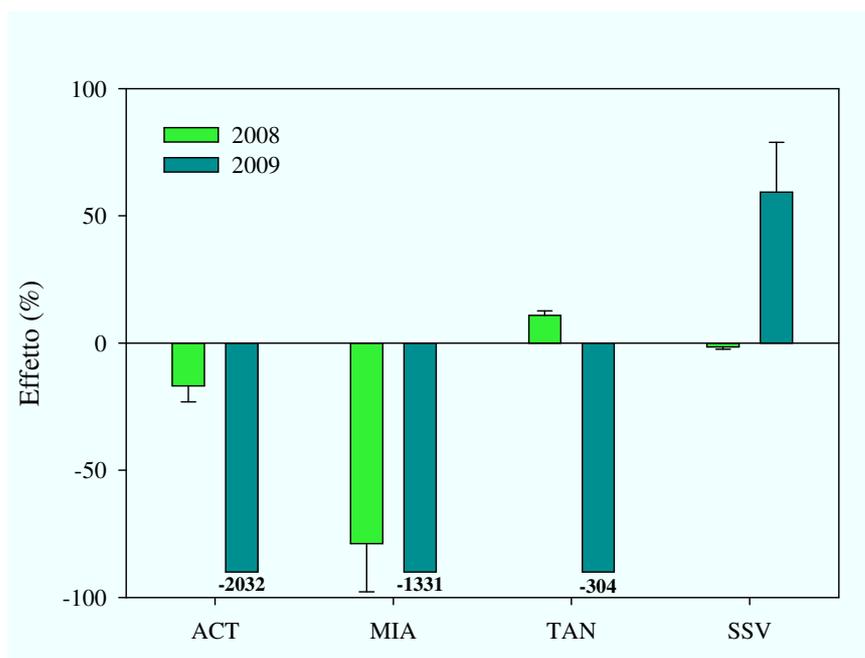


Figura 4.21. Effetto (\pm e.s.) degli estratti acquosi del suolo sulla crescita algale di *S. capricornutum*.

D. magna

Il saggio cronico con *D. magna* è stato condotto con differenti diluizioni dell'estratto acquoso dei suoli. Tutti i campioni in entrambi gli anni non hanno mostrato effetti sulla sopravvivenza della *D. magna*. Soltanto SSV ha mostrato un effetto di inibizione della sopravvivenza (20%) nel 2009 alla massima concentrazione testata (143 g l^{-1}). Questi risultati probabilmente dipendono dalle basse concentrazioni dei metalli negli estratti acquosi, le quali non provocano effetti acuti su questo invertebrato. Solitamente questo organismo è molto sensibile alla presenza dei metalli, ma in concentrazioni superiori a quelle misurate negli estratti acquosi dei suoli indagati (Murano *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2004; Seco *et al.*, 2003). Tuttavia, viene riportata la scarsa sensibilità di questo organismo quando nei lisciviati del suolo c'è presenza contemporanea di metalli e idrocarburi policiclici aromatici (Fernández *et al.*, 2006). Quindi è probabile che nei suoli oggetto di studio siano presenti anche IPA che non sono stati determinati.

4.3.4 Correlazioni tra i livelli dei metalli e i risultati di tossicità

Nella tabella 4.7 sono state riportate le correlazioni statisticamente significative calcolate confrontando i risultati di tossicità (2008-2009) ottenuti dalle due matrici (suolo tal quale ed estratto acquoso) per ogni organismo, con le concentrazioni del contenuto totale (TOT), del contenuto nella frazione disponibile (DIS) e nell'estratto acquoso del suolo (EA) dei metalli indagati.

Per il calcolo è stato utilizzato il coefficiente di correlazione lineare di Pearson (r_{Pearson}).

Per la matrice suolo tal quale la maggior parte degli organismi testati ha mostrato correlazione con almeno uno dei metalli indagati. In particolare le correlazioni riguardano i metalli Cu e Zn. Per l'estratto acquoso solo *V. fischeri* è risultato correlato con tre dei metalli indagati.

Tabella 4.7. Valori delle correlazioni statisticamente significative tra la concentrazione dei metalli ed i risultati dei test ecotossicologici.

Suolo tal quale		Estratto acquoso	
Relazione	r_{Pearson}	Relazione	r_{Pearson}
<i>V. fischeri</i> vs Cr _{TOT}	0.744 *	<i>V. fischeri</i> vs Cd _{TOT}	0.722 *
<i>S. alba</i> vs Zn _{TOT}	-0.899 **	<i>V. fischeri</i> vs Fe _{TOT}	0.745 *
<i>S. alba</i> vs Zn _{DIS}	-0.991 **	<i>V. fischeri</i> vs Mn _{DIS}	0.765 *
<i>L. Sativum</i> vs Cu _{TOT}	0.716 *		
<i>S. capricornutum</i> vs Cu _{TOT}	-0.802 *		

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

V. fischeri su suolo mostra una correlazione positiva con il contenuto totale di Cr. La sensibilità del batterio verso questo metallo è riportata da Cook *et al.* (2000), inoltre Fulladosa *et al.* (2005) hanno trovato che la vitalità del batterio decresce all'aumentare del Cr.

L. sativum mostra una correlazione diretta con Cu, questo è probabilmente dovuto alla sua sensibilità verso questo metallo. Arambašić *et al.* (1995) hanno confrontato i risultati relativi alla tossicità di Cu, Pb e Zn e fenoli relativi a *L. sativum*. Questa specie è risultata sensibile a questi composti nel seguente ordine: fenoli > Cu > Pb > Zn.

S. alba presenta una correlazione inversa sia con il contenuto totale che nella frazione disponibile di Zn. La sensibilità di questa specie a questo metallo è minore infatti rispetto a metalli come Cu e Cd (Fargašová, 2001).

S. capricornutum risulta inversamente correlato al contenuto totale di Cu. Non sono presenti in letteratura scientifica molti riferimenti riguardanti i risultati ottenuti dal

test con *S. capricornutum* su suolo. L'alga risulta sensibile ad alcuni dei metalli indagati (Aruoja *et al.*, 2004), ma con una contaminazione dovuta alla presenza di più metalli, potrebbero verificarsi meccanismi di antagonismo e gli effetti potrebbero manifestarsi come biostimolazione e non inibizione della crescita.

V. fischeri su estratto acquoso mostra una correlazione diretta con il contenuto totale di Cd e di Fe e con il contenuto nella frazione deisponibile del suolo di Mn. Questo batterio è sensibile a molti metalli (Rosen *et al.*, 2008) ma in genere la scala di sensibilità segue il seguente ordine: Cu>Cd>Pb>Zn (Macken *et al.*, 2009). Queste correlazioni potrebbero indicare che la concentrazione dei metalli pesanti, influenzano maggiormente la tossicità rispetto ai metalli biodisponibili (Calace *et al.*, 2005).

4.3.5 Indice di tossicità integrato (Toxicity test Battery integrated Index - TBI)

L'indice di tossicità integrato è stato calcolato per diversi scopi: 1) valutare le differenze ottenute dalle batterie applicate alle due matrici del suolo; 2) integrare in un unico valore la tossicità ottenuta con tutti i test per confrontare i suoli tra loro; 3) verificare il peso dei risultati ottenuti dal nuovo saggio cronico su *S. capricornutum* nel calcolo dell'indice.

In figura 4.22 sono mostrati i valori dell'indice di tossicità (TBI) calcolati con: i risultati di tossicità dell'estratto acquoso (EA), della matrice suolo tal quale (TQ) e i risultati di entrambe le matrici (TOT). I TBI TQ e TOT sono stati calcolati sia con la batteria classica (*V. fischeri*, piante, *H. incongruens*) che con l'aggiunta a questa del saggio cronico su suolo con *S. capricornutum*. Per il calcolo del TBI con EA è stata utilizzata una batteria classica composta da: *V. fischeri*, *S. capricornutum*, *D. magna*. La scala di rischio ecotossicologico in relazione al valore del TBI è la seguente:

Non significativo (TBI < 5%)

Basso (5% < TBI < 20% con C ≤ 0)

Medio (5% < TBI < 20% con C > 0)

Alto (20% < TBI < 50%)

Molto alto (TBI > 50%)

1) Confronto tra matrici

Confrontando i valori dei TBI calcolati con le due differenti matrici (EA e TQ), con una batteria di saggi ecotossicologici classica, si notano alcune differenze (fig. 4.22). Nel 2008 i TBI-EA evidenziano un rischio ecotossicologico alto per i suoli MIA e SSV, mentre non significativo per i suoli ACT e TAN. I TBI-TQ, invece, mostrano un rischio ecotossicologico alto per tutti i suoli.

Nel 2009 la situazione è molto differente. I TBI-EA mostrano un rischio molto alto per tutti i suoli escluso SSV (medio). I TBI-TQ invece rilevano un rischio basso per ACT e MIA, medio per TAN e SSV.

In generale il TBI-TQ mostra un rischio ecotossicologico simile per tutti i suoli, il TBI-EA evidenzia maggiori differenze tra i suoli.

Le differenze tra le due matrici sono dovute probabilmente al fatto che i saggi ecotossicologici sul suolo tal quale rispecchiano la tossicità globale del suolo, mentre quelli sugli estratti acquosi mettono in evidenza solo la tossicità delle sostanze più biodisponibili.

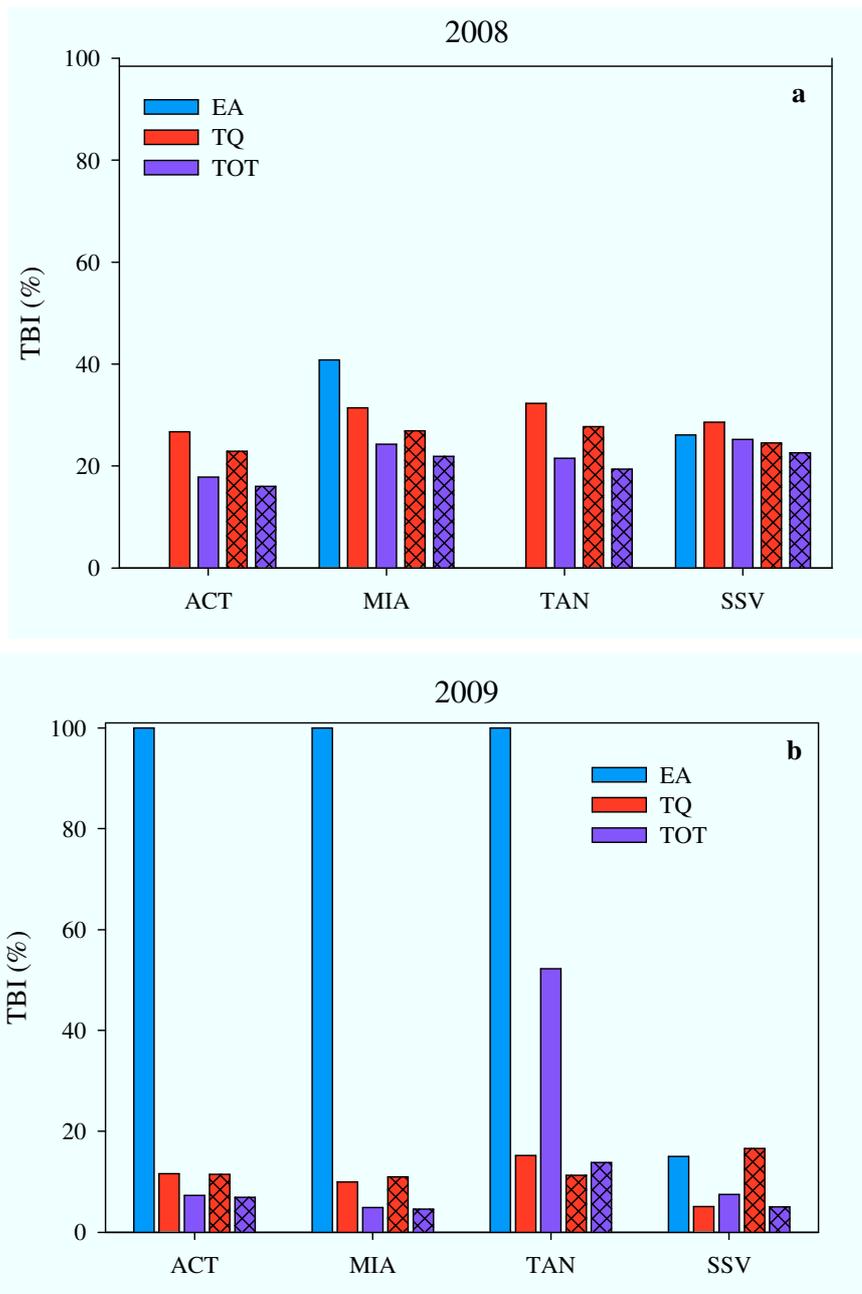


Figura 4.22 (a-b). Indice di tossicità (TBI) calcolato con i risultati di tossicità dell'estratto acquoso (EA), della matrice suolo tal quale (TQ) e i risultati di entrambe le matrici (TOT). I TBI sono stati calcolati sia con la batteria classica (colonne senza griglia) che con l'aggiunta del saggio cronico su suolo con *S. capricornutum* (colonne con griglia).

2) Tossicità totale

Per confrontare i suoli tra loro e attribuire ad ognuno di essi un giudizio sintetico di tossicità, i risultati di tutti i test (suolo tal quale + estratto acquoso) sono stati integrati in un unico indice (TBI-TOT). Sono stati considerati i risultati ottenuti con le batterie classiche. I valori dei TBI-TOT sono mostrati in figura 4.22.

In tabella 4.9 vengono mostrate le relazioni tra il rischio ecotossicologico e i livelli dei metalli, espressi come somma del contenuto totale dei metalli, per ciascun suolo.

Il rischio ecotossicologico non sempre è in accordo con i livelli dei metalli. TAN è il suolo con la minore concentrazione di metalli, in entrambi gli anni, e che presenta il rischio ecotossicologico maggiore (alto/molto alto). Probabilmente il rischio così elevato per TAN dipende anche dagli effetti tossici provocati da altri tipi di contaminanti non indagati. In questo suolo sono presenti, infatti, alte concentrazioni di IPA (Manzo *et al.*, 2008) dovute probabilmente alla sua vicinanza ad una strada extraurbana con elevato traffico veicolare. ACT in entrambi gli anni mostra un rischio ecotossicologico basso e livelli medi dei metalli. MIA e SSV invece mostrano una diminuzione del rischio ecotossicologico dal 2008 al 2009 in contrasto con l'aumento dei metalli in entrambi i suoli.

Tabella 4.8. Relazioni tra il contenuto totale dei metalli (Σ Met) ed il rischio ecotossicologico per ogni suolo.

Anno	Suolo	Σ Met (mg g^{-1})	Rischio ecotossicologico
2008	ACT	24,61	Basso
	MIA	24,88	Alto
	TAN	23,79	Alto
	SSV	31,61	Alto
2009	ACT	26,57	Basso
	MIA	26,12	Non significativo
	TAN	23,80	Molto alto
	SSV	33,03	Basso

In definitiva, sebbene il TBI-TOT non sempre corrisponde ai livelli dei metalli, potrebbe essere uno strumento valido per dare un giudizio sintetico della tossicità di un suolo. Ma soprattutto può essere utile per confrontare i suoli tra loro in maniera semplice e univoca.

3) TBI calcolati con l'aggiunta del nuovo saggio su suolo con *S. capricornutum*.

Al fine di verificare il peso del nuovo saggio cronico su *S. capricornutum* nel calcolo dell'indice, i risultati ottenuti dal test sono stati integrati a quelli ottenuti dalla batteria classica, sia per il calcolo del TBI con la matrice suolo (TBI-TQ), che per il calcolo con la matrice suolo e l'estratto acquoso (TBI-TOT). Tutti i valori sono mostrati in figura 4.22.

In tabella 4.9 sono confrontati i rischi ecotossicologici ottenuti con dalla batteria classica più il nuovo test (TBI-TQ e TBI-TOT nuovo) con quelli ottenuti della batteria classica (TBI-TQ e TBI-TOT classico).

E' possibile notare che i risultati di tossicità del saggio con *S. capricornutum* non influenzano il rischio ecotossicologico della matrice suolo, i due TBI-TQ sono abbastanza omogenei e concordanti. Al contrario alcune differenze si notano nel calcolo del TBI-TOT. Il rischio ecotossicologico per TAN calcolato con il nuovo indice si riduce notevolmente (medio-basso), rispecchiando maggiormente il livello dei metalli in questo suolo. In generale il rischio ecotossicologico con il nuovo indice è minore rispetto a quello classico. Il rischio ecotossicologico per ACT e MIA non varia confrontando i due indici.

Tabella 4.9. Confronto tra la batteria classica e quella con l'integrazione del saggio su suolo con *S. capricornutum*

Anno	Suolo	TBI-TQ classico	TBI-TQ nuovo	TBI TOT classico	TBI-TOT nuovo	Σ Met (mg g ⁻¹)
2008	ACT	Alto	Alto	Basso	Basso	24,61
	MIA	Alto	Alto	Alto	Alto	24,88
	TAN	Alto	Alto	Alto	Basso	23,79
	SSV	Alto	Alto	Alto	Alto	31,61
2009	ACT	Basso	Medio	Basso	Basso	26,57
	MIA	Basso	Medio	Non significativo	Non significativo	26,12
	TAN	Medio	Medio	Molto alto	Medio	23,8
	SSV	Medio	Medio	Basso	Non significativo	33,03

Il nuovo test su suolo con *S. capricornutum* può essere d'aiuto per integrare i risultati nel calcolo di un indice totale perché in alcuni casi rispecchia in maniera più adeguata il livello dei contaminanti indagati.

Rimane importante comunque utilizzare test su organismi appartenenti a livelli trofici differenti, test a breve e lungo termine, test su matrici differenti, per interpretare in maniera più completa possibile la tossicità di un suolo.

Relazioni tra TBI e metalli

Per verificare le relazioni tra gli indici e i livelli dei metalli è stato calcolato il coefficiente di correlazione lineare di Pearson, utilizzando in dati del 2008 e 2009 insieme

Il TBI calcolato per la matrice acquosa (TBI-EA) non è risultato statisticamente correlato con nessuno dei metalli indagati. Al contrario il TBI calcolato per la matrice suolo tal quale (TBI-TQ) ha mostrato correlazioni positive con le concentrazioni di Zn in forma totale ($r = 0,885$; $p < 0,01$), nella frazione disponibile ($r = 0,910$; $p < 0,01$) e nell'estratto acquoso ($r = 0,850$; $p < 0,01$). Questo conferma che Zn potrebbe essere il metallo responsabile della maggior parte degli effetti del suolo tal quale ottenuti sugli organismi utilizzati.

Il TBI calcolato integrando i risultati delle due matrici (TBI-TOT) è risultato correlato a sua volta a Zn in forma totale ($r = 0,859$; $p < 0,01$), nella frazione disponibile ($r = 0,872$; $p < 0,01$) e nell'estratto acquoso ($r = 0,811$; $p < 0,05$). Queste relazioni lasciano intendere che comunque i risultati dei saggi sulla matrice suolo influenzano particolarmente la tossicità globale del campione, questo è confermato anche dalla correlazione statistica tra TBI-TQ e TBI-TOT ($r = 0,886$; $p < 0,01$).

In fine l'indice calcolato integrando tutti i risultati con il nuovo saggio *S. capricornutum* (TBI-TOT nuovo) risulta correlato al TBI-TOT classico ($r = 0,8348$; $p < 0,05$) a conferma del fatto che questa nuova batteria sembra essere idonea alla valutazione della tossicità dei suoli in maniera simile a quella classica.

5. CONCLUSIONI

La ricerca si è sviluppata in due diverse fasi, una riguardante la messa a punto di nuovi saggi ecotossicologici su suolo e l'altra riguardante l' applicazione di una batteria di test ecotossicologici a quattro suoli differenti.

Le prove eseguite per la messa a punto del saggio cronico su suolo con *D. magna*, hanno permesso di individuare le migliori condizioni sperimentali per l'allestimento e per l'esecuzione del saggio. Tuttavia non è stato possibile definire un controllo positivo. Il composto chimico utilizzato (bicromato di potassio) non ha reso possibile l'identificazione di una concentrazione (o un range di concentrazioni) che avesse come effetto l'inibizione della riproduzione ma non della sopravvivenza, ovvero di verificare gli effetti cronici sulla *D. magna*. In futuro potrebbero essere testati composti chimici differenti per supportare i risultati della messa a punto del saggio.

Le prove condotte per la messa a punto del saggio cronico su suolo con *S. capricornutum*, hanno permesso di identificare una procedura sperimentale per l'esecuzione del saggio. Inoltre i risultati ottenuti con il cloruro di zinco, hanno consentito di individuare questo composto come possibile controllo positivo. La sensibilità del test verrà confermata testando altri tipi di composti e ripetendo le stesse prove nel tempo al fine di confermare anche la ripetibilità del saggio.

Nella fase di selezione della batteria di saggi ecotossicologici da applicare ai suoli, i risultati della messa a punto dei nuovi saggi su suolo hanno permesso di integrare nella batteria il test con *S. capricornutum* e di escludere al momento quello con *D. magna*.

I risultati ottenuti dall'applicazione della batteria di test ecotossicologici evidenziano l'importanza di integrare i risultati dei saggi ecotossicologici con l'analisi chimica dei contaminanti nel suolo. I test consentono di misurare gli effetti di ogni matrice del suolo su organismi appartenenti a differenti livelli trofici, ed inoltre consentono di valutare le risposte nel tempo degli organismi.

Gli effetti della contaminazione da metalli sono evidenziati in particolare da alcuni dei test ecotossicologici condotti sul suolo tal quale, probabilmente per la maggiore sensibilità di alcuni organismi ai metalli o perché le interazioni tra contaminanti, matrice e altri inquinanti non indagati possono mascherare gli effetti su alcune specie.

Gli estratti acquosi evidenziano la tossicità dei contaminanti più disponibili per la maggior parte degli organismi utilizzati.

Tra tutti i test ecotossicologici condotti, quello con *V. fischeri* si è dimostrato il test il test più sensibile, seguito dai saggi di fitotossicità (piante e alga).

L'indice di tossicità (TBI) si è rivelato uno strumento utile per la comparazione della tossicità dei suoli perché integra in un unico valore i risultati dei test di tossicità condotti con differenti organismi e su differenti matrici.

In particolare l'indice ha permesso di attribuire un giudizio relativo al rischio ecotossicologico di ogni suolo.

Il rischio ecotossicologico degli estratti acquosi in alcuni casi si è rivelato molto alto, possibile segno di allarme per una contaminazione della falda freatica. Il rischio ecotossicologico della matrice suolo tal quale tende in genere ad essere alto per tutti i suoli, perché identifica la tossicità globale, la quale non è dovuta solo alle concentrazioni dei composti chimici indagati. Nel confronto tra i suoli, TAN è risultato quello con il rischio ecotossicologico più elevato. L'indice integrato con i risultati del nuovo saggio con *S. capricornutum*, mostra in alcuni casi un minore rischio ecotossicologico dei suoli, ma riflette l'andamento del grado di contaminazione dei metalli analogamente all'indice ricavato dalla batteria senza questo nuovo saggio. La batteria di saggi ecotossicologici selezionata quindi si è dimostrata uno strumento abbastanza idoneo per la valutazione della tossicità dei suoli.

Bibliografia

Alvarenga P., Palma P., Gonçalves A. P., Fernandes R. M., de Varennes A., Vallini G., Duarte E., Cunha-Queda A. C., 2008. Evaluation of tests to assess the quality of mine-contaminated soils. *Environmental Geochemistry and Health* 30: 95-99.

An Y.-J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environmental Pollution* 127: 21-26.

APAT - IRSA/CNR 8020, 2003. Man. 29/2003. Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*.

APAT, 2006. L'ecotossicologia negli ambienti acquatici. Rapporto 71/2006.

Arambašić M. B., Bjeli S., Subakov G., 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigations and the practical applications. *Water Research* 29(2): 497-503.

Aruoja V., Kurvet I., Dubourguier H. C., Kahru A., 2004. Toxicity testing of heavy metal polluted soils with algae *Selenastrum capricornutum*: a soil suspension assay. *Environmental Toxicology*, 19(4): 396-402.

Barrios E., 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* 64: 269-285.

Baun A., Justesen K. B., Nyholm N., 2000. Algal tests with soil suspensions and elutriates: a comparative evaluation for PAH-contaminated soils. *Chemosphere* 46: 251-258.

Blaise C., Legault R., Bermingham N., van Coillie R., Vasseur P., 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment* 1:261-281.

Blaise C., Vasseur P., 2005. Algal microplate toxicity test. In: *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations* 1: 137-179. C. Blaise and J.-F. Férard (eds.).

Breure A. M., Muldera C., Römbke J., Ruf A., 2005. Ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 211-229.

Butler G. C., 1978. *Principle of Toxicology*. SCOPE 12. John Wiley and Sons. Chichester.

Calabrese E. J., Baldwin L. A., 2001. Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis. *Critical Review in Toxicology* 31: 353-424.

Calace N., Ciardullo S., Petronio B. M., Pietrantonio M., Abbondanzi F., Campisi T., Cardellicchio N., 2005. Influence of chemical parameters (heavy metals, organic matter, sulphur and nitrogen) on toxicity of sediments from the Mar Piccolo (Taranto, Ionian Sea, Italy). *Microchemical Journal* 79: 243-248.

Chao M. R., Chen C.Y., 2000. No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(6): 1589-1596.

Chial B., Persoone G., 2003. Cyst-based toxicity tests XV-Application of ostracod solid-phase microbiotest for toxicity monitoring of contaminated soils. *Environmental Toxicology* 18(5): 347-352.

Chung M. K., Hu R., Wong M. H., Cheung K. C., 2007. Comparative toxicity of hydrophobic contaminants to microalgae and higher plants. *Ecotoxicology* 16: 393-402.

Cook S. V. Chu A., Goodman R. O. N. H., 2000. Influence of salinity on *Vibrio fischeri* and lux-modified *Pseudomonas fluorescens* toxicity bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(10): 2474-2477.

Crouau Y., Pinelli E., 2008. Comparative ecotoxicity of three polluted industrial soils for the Collembola *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 643-649.

Coz A., Rodríguez-Obeso O., Alonso-Santurde R., Álvarez-Guerra M., Andrés A., Viguri J. R., Mantzavinos D., Kalogerakis N., 2008. Toxicity bioassays in core sediments from the Bay of Santander northern Spain. *Environmental Research* 106: 304-312.

Das N., Vimala R., Karthika P., 2008. Biosorption of heavy metal-An overview. *Indian Journal of Biotechnology* 7: 159-169.

Eom I. C., Rast C., Veber A. M., Vasseur P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) - contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 190-205.

EPA, 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organism. EPA-600-4-91-002.

EPA, 1996. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA-712-C-96-154.

EPA, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012.

Ettema, C. H., Wardle, D. A., 2002. Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 17 (4): 177-183.

Fargašová A., 2001. Phytotoxicity effect of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedling and their accumulation in root and shoot. *Biologia plantarum* 44(3): 471-473.

Feng N., Dagan R., Bitton G., 2007. Toxicological Approach for Assessing the Heavy Metal Binding Capacity of Soils. *Soil and Sediment Contamination* 16: 451-458.

Fernández M. D., Vega M. M., Tarazona J. V., 2006. Risk-based ecological soil quality criteria for the characterization of contaminated soils. Combination of chemical and biological tools. *Science of the Total Environment* 366: 466-484.

Forbes V. E. e Forbes T. L., 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman & Hall. pp 2-27.

Fulladosa E., Murat J. C, Villaescusa I., 2005. Effect of Cadmium(II), Chromium(VI), and Arsenic(V) on Long-Term Viability- and Growth-Inhibition Assays Using *Vibrio fischeri* Marine Bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49: 299-306.

Hamdi H., Benzarti S., Manusadžianas L., Aoyama I., Jedidi N., 2007. Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarm. *Chemosphere* 70: 135-143.

Hart W. B., Doudoroff P., Greenbank J., 1945. The evaluation of the Toxicity of Industrial Wastes, Chemicals and other Substances to Freshwater Fishes. Waste Control Laboratory, Atlantic Refining Co., Philadelphia, PA: 376 pp.

Heath A. G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology* 2nd ed. Florida: CRC Press: 359.

Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton G. A. Jr., Cairns J. Jr., 1995. *Handbook of ecotoxicology*. CRC Press, Inc. 1: 1-240.

Hoffman J., Hovorková I., Machát J., 2009. Comparison and Characterization of OECD Artificial Soils. *Ecotoxicological Characterization of Waste*. H. Moser and J. Römbke (eds.) 24: 223-229.

Hubálek T., Vosáhllová S., Matějů V., Kováčová N., Novotný Č., 2007. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52: 1-7.

Imperato M., Adamo P., Naimo D., Arienzo M., Stanzione D., Violante P., 2003. Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). *Environmental Pollution* 124: 247-256.

Irha N., Steinnes E., Kirso U., Petersell V., 2009. Mobility of Cd, Pb, Cu, and Cr in some Estonian soil types. *Estonian Journal of Earth Sciences* 58(3): 209-214.

IRSA-CNR, 1991. Quaderni, 93. Saggio di tossicità con daphnia.

ISO 6341:1996. Water Quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test.

ISO 11348:1998. Water quality - determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test).

Janssen C. R., Heijerick D. G., 2003. Algal toxicity tests for environmental risk assessments of metals. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 178: 23-52.

Kahru A., Ivask A., Kasemets K., Põllumaa L., Kurvet I., François M., Dubourguier H. C., 2005. Biotests and biosensors in ecotoxicological risk assessment of field soils polluted with zinc, lead and cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (11): 2973-2982.

Kamnev A. A., van der Lelie D., 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports* 20(4): 239-258.

Karlen D. L., Mausbach M. J., Doran J. W., Cline R. G., Harris R. F., Schuman G. E., 1997. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Science Society of American Journal* 61(1):4-10.

Kramer K. J. M., Jak R. G., van Hattum B., Hooftman R. N., 2004. Copper toxicity in relation to surface water-dissolved organic matter: biological effects to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(12): 2971-2980.

Lakanen E., Ervio R., 1971. A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soil. *Suom Maataloustiet Seuran Julk* 123: 223-232.

Leitgib L., Kálmán J., Gruiz K., 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their extract from contaminated sites. *Chemosphere* 66: 428-434.

Lindsay, W.L., Norwell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of American Journal* 42, 421-428.

Macken A., Giltrap M., Ryall K., Foley B., McGovern E., McHugh B., Davoren M., 2009. A test battery approach to the ecotoxicological evaluation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicology* 18: 470-480.

Madrid L., Díaz-Barrientos E., Madrid F., 2002. Distribution of heavy metal content of urban soils in parks of Seville. *Chemosphere* 49:1301-1308.

Manzo S., De Nicola F., De Luca Picione F., Maisto G., Alfani A., 2008. Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere* 71: 1937-1944.

Mielke H. W., Wang G., Gonzales C. R., Le B., Quach V. N., Mielke P. W., 2001. PAH and metal mixtures in New Orleans soils and sediments. *The Science of the Total Environment* 281: 217-227.

Morel J. L., 1997. Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. In: *Soil Ecotoxicology*, J. Tarradellas, G. Bitton and D. Rossel (eds.), Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, 6: 141-176.

Murano H., Matsuzaki K., Shiraishi H., Wakabayashi M., 2007. Effects of heavy metals in river waters in Japan on immobility and mortality of *Daphnia magna* and *Oryzias latipes* larvae. *Fisheries Science* 73: 1078-1086.

Muysen B. T. A., Janssen C. R., 2001. Zinc acclimation and its effect on the zinc tolerance of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* in laboratory experiments. *Chemosphere* 45(4/5): 507-514.

Nahmani J., Hodson M. E., Black S., 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* 145: 402-424.

OECD, 1984. Terrestrial plants: growth test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 208, Paris, France.

OECD, 1998. *Daphnia magna* reproduction test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 211, Paris, France.

OECD, 2004. *Daphnia* sp. Acute Immobilization Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 202, Paris, France.

OECD, 2004. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Guidelines for Testing of Chemicals 222, Paris, France.

Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S., 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* 32: 265-268.

Peng J. f., Song Y. h., Yuan P., Cui X. y., Qiu G. l., 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *Journal of Hazardous Materials* 161: 633-640.

Perin G., 2004. Metodi Biologici di Previsione degli Effetti Ambientali degli Stressori. *Ecotossicologia, Ambiente e Salute* 5: 1-41.

Persooone G., Baudo R., Cotman M, Blaise C., Thompson K. C., Moreira-Santos M., Vollat B., Törökne A., Han T., 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test-Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 393(01).

Petruzzelli G, Pedron F., 2007. Meccanismi di biodisponibilità nel suolo di contaminanti ambientali persistenti. *Rapporti ISTISAN* 07(50):68-75.

Ramakrishnaiah H., Somasheka R. K., 2002. Heavy metal contamination in roadside soil and their mobility in relations to pH and organic carbon. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 11: 643-654.

Rand G. M., Wells P. G., McCarty L. S., 1995. Introduction to Aquatic toxicology. In: Rand G.M. (Ed). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effect, Environmental Fate, and Risk Assessment* 2nd edition. Washington D. C., Taylor & Francis: 3-67. 1995.

Roh J. y., Sim S. J., Yi J., Park K., Chung K. H., Ryu D.-y., Choi J., 2009. Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics. *Environmental Science & Technology* 43 (10): 3933-3940.

Rosen G., Osorio-Robayo A., Rivera-Duarte I., Lapota D., 2008. Comparison of Bioluminescent Dinoflagellate (QwikLite) and Bacterial (Microtox) Rapid Bioassays for the Detection of Metal and Ammonia Toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 606-611.

Salvagio Manta D., Angelone M., Bellanca A., Neri R., Sprovieri M., 2002. Heavy metals in urban soils: a case study from the city of Palermo (Sicily), Italy. *The Science of the Total Environment* 300: 229-243.

Schultz E., Joutti A., Räisänen M. L., Lintinen P., Martikainen E., Letho O., 2004. Extractability of metals and ecotoxicity of soils from two old wood impregnation sites in Finland. *Science of the Total Environment* 326: 71-84.

Scullion J., 2006. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften* 93: 51-65.

Seco J. I., Fernández-Pereira C., Vale J., 2003. A study of the leachate toxicity of metal-containing solid wastes using *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 339-350.

Seybold C. A., Mausbach M. J., Karlen D. L., Roger H. H., 1997. Quantification of soil quality. In: Lal R. Kimble J. M., Follett R. F., Stuart B. A., editors. *Soil processes and the carbon cycle*.

Spurgeon D., Svendsen C., Rimmer V. R., Hopkin H. P., Weeks J., 2000. Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(7): 1800-1808.

Sverdrup L. E., Krogh P. H., Nielsen T., Stenersen J., 2002. Relative sensitivity of three terrestrial invertebrate test to polycyclic aromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(9): 1927-1933.

St-Laurent D., Blaise C., Macquarrie P., Scroggins R., Trottier B., 1992. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environmental Toxicology & Water Quality* 7(1): 35-48.

Tarello C., 2004. Il suolo: un'entità piena di vita. *Environnement* 27: 5-9.

Tchounwou P. B., Reed L., 2000. Effects of cadmium and lead on the bioluminescence of *Vibrio fischeri* and the growth and O₂ uptake of microorganisms. In: Centeno J. A., Collert P., Vernet G., Finkelman R. B., Gibb H., Etienne J.-C. (Eds.). *Metal Ions in Biology and Medicine* 6: 682-684.

Tiedje J. M., Cho J. C., Murray A., Teves D., Xia B., Zhou J., 2001. Soil teeming with life: new frontiers to soil science. In: Rees, R.M., Ball, B.C., Campbell, C.D., Watson, C.A. (Eds.), *Sustainable Management of Soil Organic Matter*. CAB International, Wallingford, 393-412.

Tsai, K. P., and Chen, C. Y. 2007. An algal toxicity database of organic toxicants derived by a closed-system technique. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1931-1939.

Van Gestel C. A. M., Léon C. D., van Straalen N. N., 1996. In: *Soil Ecotoxicology*, 11: 291-317, J. Tarradellas, G. Bitton and D. Rossel (eds.), Lewis

van Straalen N. M., 2002. Assessment of soil contamination - a functional Perspective. *Biodegradation* 13(1): 41-52.

Walker C. H., Hopkin S. P., Sibly R. M., Peakall D. B., 1996. Principles of Ecotoxicology. London, Taylor & Francis: 321.

Wang Q.-Y., Zhou D.-M., Cang L., Sun T.-R., 2009. Application of bioassays to evaluate a copper contaminated soil before and after a pilot-scale electrokinetic remediation. *Environmental Pollution* 157: 410-416.

Wright D. A., Welbourn P., 2002. *Environmental Toxicology*. Cambridge, U.K. Cambridge University Press: 630.