

Dalla valutazione dello stato qualitativo alla identificazione delle cause di alterazione negli ambienti acquatici: un obiettivo raggiungibile?

Valerio Pellegrini, Antonio Suppa, Annamaria Buschini, Gessica Gorbi*

Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 11/A – 43124 Parma, Italia

* Referente per la corrispondenza: gessica.gorbi@unipr.it

Pervenuto il 24.2.2017; accettato il 15.5.2017

Riassunto

Lo studio è stato finalizzato alla definizione di una strategia integrata di monitoraggio dei corsi d'acqua in grado di rilevare fattori di stress. Saggi tossicologici (acuti e cronici), genotossicologici (Comet Assay) e tossicogenomici con *Daphnia magna*, affiancati all'analisi della struttura delle comunità di macroinvertebrati bentonici, sono stati applicati a campioni prelevati in tratti di alcuni corsi d'acqua della Val Parma soggetti a differenti livelli di pressione antropica. I risultati ottenuti indicano che la batteria di saggi utilizzata è in grado di rilevare la presenza di fattori di stress ambientale e costituiscono una base per l'applicazione dei saggi con *D. magna* nell'ambito del monitoraggio investigativo dei corsi d'acqua.

PAROLE CHIAVE: monitoraggio ambientale / *Daphnia magna* / test cronico / Comet Assay / Val Parma

From the evaluation of the actual quality status to the identification of possible drivers of alteration in freshwater ecosystems: an achievable goal?

Toxicological (acute and chronic test), genotoxicological (Comet Assay) and toxicogenomic bioassays with *Daphnia magna*, together with the analysis of macrobenthic community structure, were applied to water samples from sections of Parma Valley water courses subjected to different levels of anthropic pressure. These results support the application of eco-genotoxicological assays with *D. magna* in investigative monitoring of freshwater ecosystems.

KEY WORDS: freshwater monitoring / *Daphnia magna* / chronic test / Comet Assay / Parma Valley

INTRODUZIONE

La Direttiva Europea WFD 2000/60 è lo strumento legislativo più importante emanato in Europa in materia di valutazione e protezione della qualità delle acque. La direttiva richiede agli Stati membri di definire non solo lo Stato Ecologico (ES) e lo Stato Chimico (CS), ma anche le pressioni più importanti che insistono su un corpo idrico, e di promuovere azioni finalizzate al raggiungimento di un ES buono entro il 2025. Da un'indagine effettuata a scala

europea è emerso che le pressioni più importanti sono costituite dall'aumento delle concentrazioni di nutrienti –che possono causare eutrofizzazione– dagli scarichi degli impianti di trattamento delle acque reflue –che possono immettere xenobiotici persistenti (quali interferenti endocrini e sostanze genotossiche)– dai pesticidi usati in agricoltura e dalle modificazioni idromorfologiche che possono causare alterazioni degli habitat (European Environment Agency,

2012). La combinazione delle diverse pressioni che insistono su un tratto di un corpo idrico ne determina lo stato ecologico e chimico. In ambito gestionale sono quindi indispensabili strumenti di indagine che consentano di distinguere e identificare, ove necessario, i diversi fattori di stress per poter attuare gli interventi idonei al raggiungimento di un ES buono (Suter II *et al.*, 2002; Wernersson *et al.*, 2015). Scopo del presente studio è stato lo sviluppo di una strate-

gia integrata di monitoraggio che, unitamente all'approccio chimico ed ecologico, possa costituire uno strumento, facilmente applicabile, per ricercare le cause di un alterato stato ecologico. A questo scopo, sono stati utilizzati metodi tossicologici (test acuti e cronici), genotossicologici (Comet Assay) e tossicogenomici affiancati all'analisi della struttura delle comunità di macroinvertebrati bentonici. Per le indagini eco-genotossicologiche è stata utilizzata la specie modello *Daphnia magna* Straus esposta *in vivo* a campioni d'acqua prelevati in tratti di corpi idrici superficiali soggette a differenti livelli di pressione antropica.

MATERIALI E METODI

Area di studio e campionamento

Lo studio è stato incentrato su corsi d'acqua della Val Parma ed ha preso in considerazione sia il corso d'acqua principale, Torrente Parma, sia corpi idrici del reticolo idrografico minore (Canale Naviglio Navigabile e Canale Galasso). Le stazioni nelle quali nel 2014 è stata raccolta la matrice acquosa sottoposta a saggio e le corrispondenti classi di qualità (Stato Ecologico, ES; Stato Chimico, CS) determinate da ARPA Emilia Romagna (2014) sono le seguenti:

- stazione 1: situata sul Torrente Parma –pochi Km a valle delle sorgenti– in un'area montana (785 m slm) caratterizzata da scarsa attività antropica e per questo selezionata come possibile stazione/condizione di riferimento: ES= buono, CS= buono;
- stazione 2: situata sul Torrente Parma a valle di Langhirano, in una zona pedemontana (165 m slm); è caratterizzata da una moderata attività antropica sia agricola che industriale: ES=

- sufficiente, CS= buono;
- stazione 3: localizzata sul Torrente Parma a valle della confluenza dei canali Naviglio Navigabile e Galasso e poco prima della confluenza del torrente stesso con il Fiume Po (24 m slm): ES= sufficiente, CS= buono.
- stazione 4: situata sul Canale Naviglio Navigabile, corso d'acqua del reticolo idrografico minore, in una zona ad alto impatto antropico e 11 Km a valle dell'immissione dell'effluente di scarico del depuratore est della città di Parma, poco a monte della confluenza del canale stesso con il T. Parma (30 m slm): ES= cattivo, CS= buono;
- stazione 5: situata sul Canale Galasso, corso d'acqua del reticolo minore destinato ad uso irriguo, a valle di una zona ad alto impatto antropico (per attività sia industriale che agricola intensiva) poco a monte della immissione del canale stesso nel T. Parma (30 m slm): ES= scarso, CS= buono.

In ogni stazione è stato prelevato un singolo campione puntuale raccolto con taniche in PET da 25 litri. Sui campioni sono stati misurati pH e conducibilità entro 2 ore dalla raccolta. Contemporaneamente al prelievo dell'acqua, in ogni singola stazione è stato effettuato anche un campionamento della macrofauna bentonica per l'analisi della struttura della comunità ed il calcolo dell'Indice Biotico Esteso (IBE).

Allevamento di *Daphnia magna*

Organismi adulti della specie *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera), in fase di riproduzione partenogenetica, sono stati allevati in acqua naturale commerciale (pH = 7,5; conducibilità = 417 μ S/cm) precedentemente aerata per 24 h. Le colture sono state mantenute in

camera climatizzata (temperatura = 20 ± 1 °C; fotoperiodo = 16h luce:8h buio, utilizzando lampade fluorescenti cool-white a intensità luminosa pari a 800 lux). Ad ogni rinnovo del mezzo, gli organismi sono stati alimentati con aliquote di colture dell'alga verde unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* Korshikov (6×10^5 cellule/mL) in fase di crescita esponenziale, coltivate secondo il metodo US-EPA (1978), e di sospensioni di lievito *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, 1883 (6×10^5 cellule/mL) secondo il metodo APAT IRSA-CNR (2003). Il mezzo di allevamento è stato completamente rinnovato due volte a settimana trasferendo solo le femmine adulte.

Saggi biologici

Sui campioni acquosi tal quali sono stati effettuati saggi a breve termine (48 h di esposizione) con neonati di *D. magna* (età ≤ 24 h) per verificare l'assenza di tossicità acuta.

I campioni sono stati filtrati (0,45 μ m), per eliminare l'eventuale presenza di fonti alimentari addizionali, e conservati a 4 °C fino al momento del loro utilizzo per i saggi di tossicità cronica e genotossicità e per la valutazione dell'attività trascrizionale dei geni selezionati.

Il saggio di tossicità cronica (21 gg; test statico con rinnovo a giorni alterni) è stato realizzato alimentando gli organismi con l'alga verde unicellulare *Pseudochirkneriella subcapitata* (3×10^5 cell/mL) ed il lievito *Saccharomyces cerevisiae* (3×10^5 cell/mL). Il mezzo di coltura delle alghe, prima del loro utilizzo per l'alimentazione, è stato eliminato mediante centrifugazione (2000 g per 10 min), lavaggio e risospensione del pellet in acqua di allevamento dei dafnidi. Per ciascun campione e per il controllo

di laboratorio sono stati utilizzati 10-15 neonati (età ≤ 24 h) mantenuti singolarmente in un volume pari a 100 mL. Come controllo di laboratorio è stata usata la stessa acqua naturale utilizzata per l'allevamento, arricchita con gli oligoelementi indicati per la preparazione del mezzo artificiale ELENDDT M4 (OECD, 2012). Come endpoint sono stati considerati: percentuale di sopravvivenza al 21° giorno, età media alla riproduzione, fecondità (= n° di neonati vivi per femmina sopravvissuta fino al 21° giorno) e Failed Development % (FD%) calcolato nel modo seguente:

$$FD\% = (n^{\circ} \text{uova abortite} + n^{\circ} \text{neonati non vitali}) / (n^{\circ} \text{neonati vivi} + n^{\circ} \text{uova abortite} + n^{\circ} \text{neonati non vitali})$$

Il test è stato ritenuto valido se il controllo di laboratorio rispettava i criteri di validità indicati dalla OECD 211 Guideline (2012), cioè un n° medio di neonati vivi (per femmina sopravvissuta fino al 21° giorno) ≥ 60 (CV% $\leq 25\%$) e mortalità degli organismi $\leq 20\%$.

I saggi genotossicologici (Comet Assay) sono stati effettuati secondo il metodo descritto da Pellegrini *et al.* (2014). Come endpoint è stata considerata la Tail Intensity % (TI%), il cui valore aumenta all'aumentare del danno al DNA.

Per l'analisi dell'espressione genica, gruppi di 50 organismi di età omogenea (≤ 24 h) sono stati mantenuti per 4 giorni nelle stesse condizioni di allevamento sopra descritte e alimentati con *Pseudochirkneriella subcapitata* (3×10^5 cell/mL/giorno) e *Saccharomyces cerevisiae* (3×10^5 cell/mL/giorno). Dopo tale periodo, gli organismi sono stati trasferiti nei campioni d'acqua da saggiare (50 individui/200 mL) in assenza di alimento. Dopo 48 h di esposizione i campioni sono stati filtrati su retino di nylon (a maglie di 50 μm) e gli organismi, raccolti deli-

catamente con un ago, sono stati trasferiti in eppendorf da 1,5 mL, congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C fino al momento dell'estrazione di RNA effettuata secondo la procedura descritta in Suppa *et al.* (2017). L'incremento (up-regolazione) e la diminuzione (down-regolazione) dell'attività trascrizionale dei geni vitellogenina 1 (vtg1), cuticola 12 (cut12), precursore della carbossipeptidasi A1 (cpa1) ed emoglobina 1 (dhh1) rispetto agli organismi controllo sono stati considerati indicativi di esposizione a sostanze con attività pseudo-ormonale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In figura 1 sono riportati alcuni risultati ottenuti dai saggi eco-genotossicologici e il valore di IBE rilevato nel giorno del campionamento. Per completezza e facilità di comparazione, sono inoltre riportati i risultati qualitativi dei test tossicogenomici descritti analiticamente e quantitativamente in Suppa *et al.* (2017).

In tutti i campioni saggiati, la sopravvivenza dei dafnidi è stata $> 80\%$ e non sono state osservate differenze significative nell'età media alla riproduzione rispetto al controllo di laboratorio (dati non riportati). La fecondità è risultata elevata (> 60 neonati/femmina), con FD% trascurabili, nei campioni di tutte le stazioni con la sola eccezione della stazione 4 localizzata sul corso d'acqua che riceve l'effluente del depuratore. L'esposizione al campione di acqua prelevato in questa stazione ha indotto una drastica riduzione della fecondità ed un forte incremento nel numero di uova abortite e neonati non vitali. Negli organismi esposti all'acqua delle stazioni di valle (Stazioni 3, 4 e 5) sono stati osservati valori molto elevati di TI% ed una generale alterazione

dell'attività trascrizionale dei geni considerati.

Tutte le linee di evidenza ottenute dai saggi biologici indicano un graduale peggioramento qualitativo delle acque da monte a valle, in accordo con l'indice di qualità biologica IBE. Gli organismi allevati nel campione della stazione di monte (stazione 1) hanno mostrato, per tutti gli endpoint, valori simili al controllo di laboratorio con la sola eccezione dell'attività trascrizionale del gene vtg1. Per quanto questo aspetto non sia da trascurare, la stazione 1 sembra una buona candidata a rappresentare le condizioni di riferimento del bacino. Nella stazione pedemontana (stazione 2) si osserva già uno scadimento dello stato qualitativo (IBE= 7) e un'alterata attività trascrizionale in *D. magna*. Nella stazione 4 sono state riscontrate le condizioni peggiori, con effetti ascrivibili a presenza di sostanze tossiche, a livelli subletali, genotossiche e con attività pseudo-ormonale. Anche nel campione della stazione 5 la risposta dei dafnidi indica contaminazione da sostanze genotossiche e ad attività pseudo-ormonale, sebbene non sia stata osservata alterazione dell'attività riproduttiva. Negli organismi esposti al campione della stazione del corso d'acqua principale posta a chiusura del bacino (stazione 3) è risultato elevato l'effetto genotossico e permangono le alterazioni a livello trascrizionale, effetti che possono essere dovuti, almeno in parte, al carico di contaminanti veicolato dai due canali immissari. Nonostante lo stato chimico sia risultato buono in tutti i tratti dei corsi d'acqua monitorati, gli effetti osservati in *D. magna* non stupiscono se si considera che nelle acque delle sezioni 3, 4 e 5 sono stati rinvenuti numerosi pesticidi, seppure a concentrazioni inferiori ai rispettivi limiti di legge (ARPA-

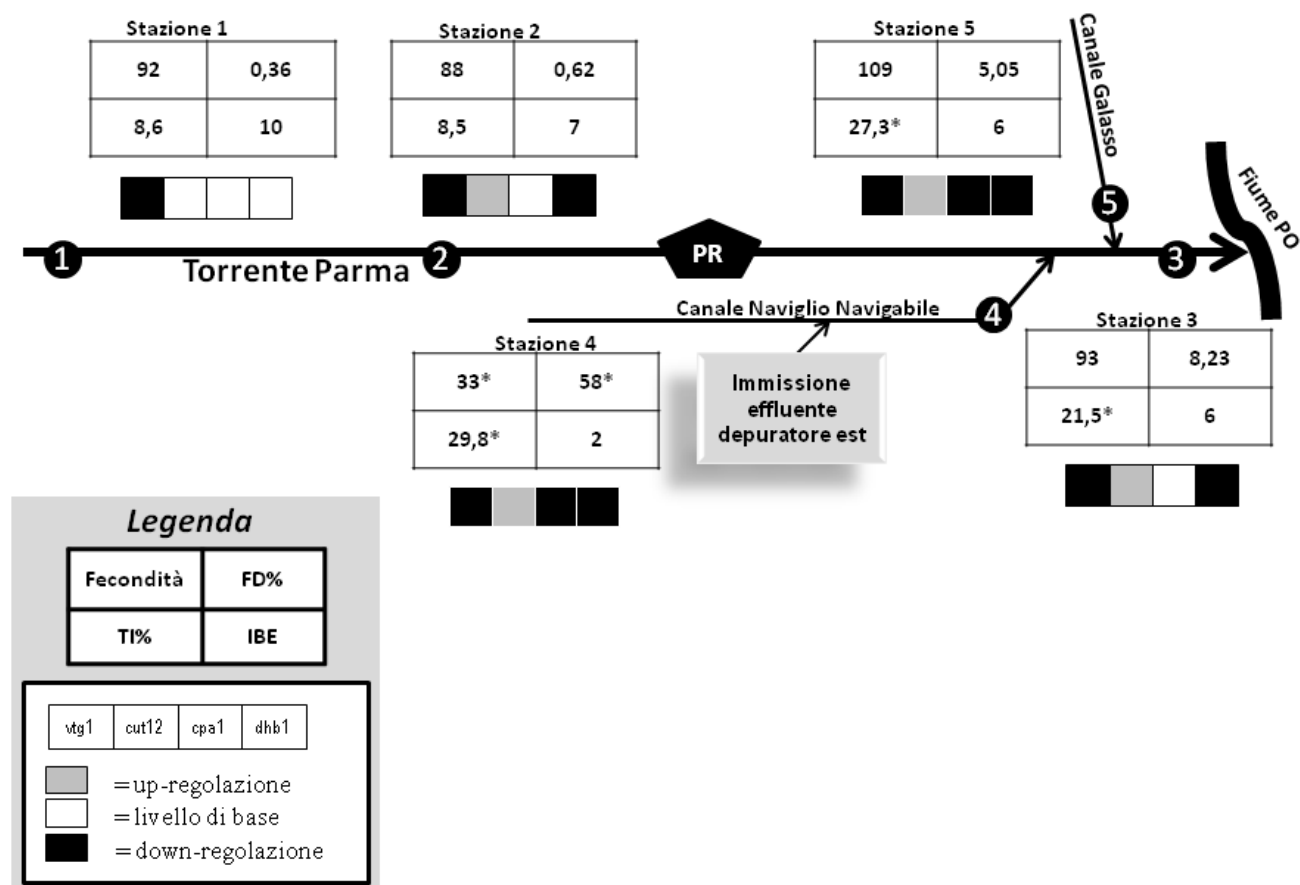


Fig. 1. Risultati ottenuti dai saggi eco-genotossicologici con *Daphnia magna* esposta *in vivo* ai campioni d'acqua prelevati nelle diverse stazioni (1, 2, 3, 4 e 5) e dall'analisi della struttura della comunità macrobentonica (Indice Biotico Esteso, IBE). Per ciascuna stazione è riportato inoltre il dato qualitativo relativo alla modulazione dell'attività trascrizionale dei geni *vtg1*, *cut12*, *cpa1* e *dhh1* (vedi Suppa *et al.*, 2017). *: significativamente diverso rispetto al controllo di laboratorio (ANOVA e test di Tukey, $p < 0,01$). Fecondità = numero medio di neonati per femmina sopravvissuta fino al 21° giorno; FD% = Failed Development %; TI% = Tail Intensity %. PR = città di Parma.

Tab. I. Pesticidi rilevati nelle sezioni di valle (ARPA-ER Sezione di Parma, 2014).

Stazione	Sostanza chimica	
C. Galasso – stazione 5	Fungicidi	metalaxil, procloraz, propiconazolo
	Erbicidi	pirazone (cloridazon-iso), lenacil, metamidron, metolaclor, metribuzin, oxadiazon, propizamide, terbutilazina, desetil terbutilazina
	Insetticidi	clorantraniliprololo (DPX E-2Y45), dimetoato, imidacloprid, thiamethoxam
C. Naviglio Navigabile – stazione 4	Fungicidi	azostrobin, boscalid, epossiconazolo, fenamidone, iprovalicarb, metalaxil, procloraz, propiconazolo, tetraconazolo
	Erbicidi	pirazone (cloridazon-iso), diuron, metamidron, metolaclor, oxadiazon, petoxamide, terbutilazina, desetil terbutilazina
	Insetticidi	clorantraniliprololo (DPX E-2Y45), dimetoato, imidacloprid, thiamethoxam
T. Parma – stazione 3	Fungicidi	metalaxil, propiconazolo
	Erbicidi	pirazone (cloridazon-iso), lenacil, metamidron, metolaclor, metribuzin, oxadiazon, propizamide, terbutilazina
	Insetticidi	clorantraniliprololo (DPX E-2Y45), imidacloprid

ER, 2014) (Tab. I). La presenza di numerosi xenobiotici può infatti avere effetti additivi/sinergici, dannosi per il biota acquatico, che i saggi biologici sono in grado di rilevare.

CONCLUSIONI

Nel loro insieme i risultati ottenuti hanno mostrato una buona aderenza alle risposte attese sulla base dello stato qualitativo delle stazioni analizzate e delle pressio-

ni antropiche ascrivibili all'uso del territorio ad esse sotteso. I metodi applicati in questo studio possono quindi costituire utili strumenti nel monitoraggio dei corsi d'acqua e consentire di individuare i siti ove focalizzare le ricerche sugli stressor. Le linee di evidenza dovranno comunque essere confermate con ulteriori sperimentazioni. I saggi utilizzati sono inoltre incentrati su un organismo, *Daphnia magna*, previsto dalla

Legislazione Italiana nell'ambito della prevenzione ambientale e già utilizzato dalle Agenzie Regionali per l'Ambiente. Questi due aspetti possono costituire una base per l'estensione dell'utilizzo di *D. magna* nell'ambito del monitoraggio investigativo finalizzato alla ricerca dei fattori di stress in corpi idrici classificati "a rischio" secondo la Direttiva Quadro europea sulle acque (Water Framework Directive 2000/60).

BIBLIOGRAFIA

- APAT IRSA-CNR, 2003. *Manuali e linee guida 29/2003 - Serie 8000 - Metodi Ecotossicologici*. Roma: 993-1002.
- ARPA-ER (PR), 2014. *Report sullo stato delle acque superficiali in Provincia di Parma (triennio 2010-2012)*.
- European Environment Agency (2012). *EEA Water 2012 Report - Thematic assessment on Ecological and Chemical Status and pressures*.
- OECD, 2012. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.
- Pellegri V., Gorbi G., Buschini A., 2014. Comet Assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*, 155: 261-268.
- Suppa A., Pellegri V., Montalbano S., Gorbi G., Buschini A., 2017. Metodi tossicogenomici nel monitoraggio degli ambienti acquatici: modulazione dell'attività trascrizionale in *Daphnia magna*. *Biologia Ambientale*, **31**: 211-217 (questo volume).
- Suter G.W. II, Norton S.B., Cormier S.M., 2002. A methodology for inferring the causes of observed impairments in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**: 1101-1111.
- US-EPA, 1978. *The Selenastrum capricornutum Printz algal assay bottle test. Experimental design, application and data interpretation protocol*.
- Wernersson A.S., Carere M., Maggi C., Tusil P., Soldan P., James A., Sanchez W., Dulio V., Broeg K., Reifferscheid G., Buchinger S., Maas H., Van Der Grinten E., O'Toole S., Ausili A., Manfra L., Marziali L., Polesello S., Lacchetti I., Mancini L., Lilja K., Linderth M., Lundberg T., Fjällborg B., Porsbring T., Larsson D.J., Bengtsson-Palme J., Förlin L., Kienle C., Kunz P., Vermeirssen E., Werner I., Robinson C.D., Lyons B., Katsiadaki I., Whalley C., Den Haan K., Messiaen M., Clayton H., Lettieri T., Carvalho R.N., Gawlik B.M., Hollert H., Di Paolo C., Brack W., Kammann U., Kase R., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe*, **27**: 1-11.