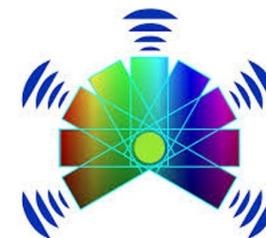




Dipartimento di
Scienze
Ambientali,
Informatica e
Statistica DAIS



Piano Nazionale
Lauree Scientifiche
Progetto:
Scienze Naturali e Ambientali

La misura della tossicità

Introduzione ai test di tossicità

- fattori che influenzano la tossicità
- tossicità acuta
- tossicità cronica

Dr. Marco Picone

marco.picone@unive.it



La tossicità

La tossicità si manifesta come insorgenza di “effetti avversi” nei confronti degli organismi entrati in contatto con un contaminante (fase tossicodinamica)

L'entità degli effetti avversi è legata a:

- Tossicità intrinseca del contaminante

caratteristiche chimico-fisiche

- **Modalità di esposizione**

durata e frequenza dell'esposizione

- **Condizioni ambientali in cui avviene l'esposizione**

- **Concentrazione che entra in contatto con l'organismo**

- **Caratteristiche degli organismi indicatori**



L'esposizione

Rappresenta l'insieme delle vie attraverso cui avviene il contatto con il contaminante (da ERA)

Nella misura della tossicità le modalità di esposizione sono distinte sulla base di 2 parametri fondamentali, la **concentrazione** della sostanza presente nel *medium* (acqua, sedimento, cibo) e la **durata** dell'esposizione cui è soggetto un organismo.

Si riconoscono quindi:

- esposizione acuta
- esposizione cronica
- esposizione sub-cronica



Esposizione acuta

L'**esposizione acuta** prevede il contatto tra gli organismi indicatori ed **elevate concentrazioni** di contaminante per un periodo di **tempo limitato** (< 96-h).

La durata dell'esposizione acuta è comunque sempre da relazionare alla lunghezza del ciclo vitale dell'organismo coinvolto (i.e. per gli anfipodi il test acuto dura 10 gg).

L'effetto generato da una esposizione acuta (generalmente la morte) può essere **immediato** o **ritardato** nel tempo (i.e. nel caso di radiazioni)



Esposizione cronica

In un'esposizione cronica gli organismi vengono a contatto con **concentrazioni basse** di contaminante per un **prolungato periodo**

Idealmente, il periodo coinvolto in una esposizione cronica dovrebbe abbracciare **l'intero ciclo vitale** dell'organismo (life-cycle test)

Le concentrazioni cui è esposto l'organismo possono essere **costanti e continue** oppure ripetute nel tempo (**episodio ciclico**) e generare effetti reversibili oppure irreversibili, cumulativi e non



Esposizione sub-cronica

L'esposizione sub-cronica ha durata intermedia tra acuta e cronica

Non abbraccia l'intero ciclo vitale dell'indicatore biologico, ma prevede l'esposizione a contaminanti delle fasi critiche dello stadio vitale, incluse le fasi larvali (**early-life stages**), quindi la durata dell'esposizione è spesso legata al tempo necessario affinché la larva raggiunga una determinata "fase"

L'esposizione in test sub-cronici varia dalle 48 ore di alcuni test su fasi larvali di invertebrati fino ai 7 giorni dei test su crostacei copepodi



Parametri ambientali

Ogni specie presenta dei range ideali (**optimum**) di variazione per ciascun fattore abiotico (T, S, pH), in cui l'organismo funziona più efficientemente

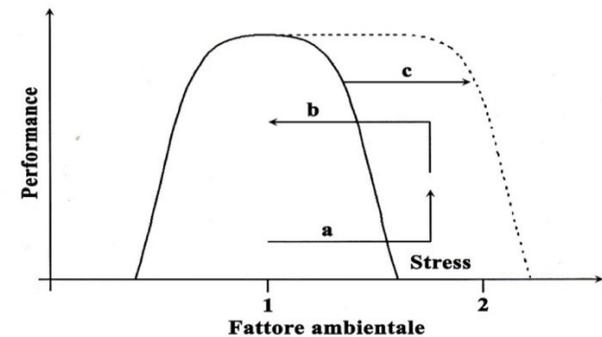
Se un fattore si sposta verso livelli al di fuori del range ideale, l'organismo deve mettere in atto dei processi fisiologici che gli consentano di **compensare** lo spostamento dalla condizione di optimum, investendo tuttavia **energia aggiuntiva** in questa opera di compensazione.

Se per la **compensazione** il dispendio metabolico diventa troppo elevato, l'organismo dispone di minori energie per la riproduzione e la ricerca del cibo (deficit energetico)

Parametri ambientali

Se un organismo è sotto stress o esprime un eccessivo investimento metabolico per compensare condizioni ambientali non ottimali, l'aggiunta di effetti di tossicità fa sì che l'organismo sia meno capace di reagire e compensare l'effetto tossico

Questo aumenta significativamente la sua sensibilità ai contaminanti



La condizione di stress (a) può essere superata, se le condizioni ambientali rientrano all'interno della finestra di optimum (b), oppure se l'organismo si "adatta" alle nuove condizioni ambientali (c)



Temperatura

Non **esiste uno specifico pattern** per gli effetti della temperatura sulla tossicità degli inquinanti per gli organismi acquatici

Il cambiamento di T in una data direzione può aumentare, diminuire, o non causare cambiamenti nella tossicità, dipende dalla sostanza, dalla specie

Gli studi effettuati suggeriscono che T non abbia nel complesso marcate influenze sulle soglie di effetto cronico degli inquinanti

Sia per i metalli che per gli organici (fenolo, LAS, DDT e altri pesticidi) sono state trovate variazioni al massimo di un fattore 2-4 (Sprague, 1995).



pH

Regola l'**equilibrio di dissociazione** delle sostanze ionizzabili modificandone l'attività biologica e modifica la speciazione dei metalli; esempio classico è **ammoniaca**, per cui è molto più tossica la forma non ionizzata (NH_3) la cui concentrazione aumenta all'aumentare del pH

In acque dolci il pH assume particolare importanza soprattutto per la disponibilità dei metalli, con Al che in ambiente acido diventa particolarmente aggressivo per i tessuti delle branchie

Il pH inoltre può influire direttamente sulla vitalità di alcune fasi critiche del ciclo vitale.

Ad esempio valori di pH elevati (vicini al 9) comportano una significativa riduzione della motilità degli spermatozoi dei ricci di mare, che restano vitali in soluzione per meno tempo rispetto a condizioni più neutre

Si genera così un effetto negativo che può aggravare gli effetti determinati dalla presenza dei contaminanti



Salinità

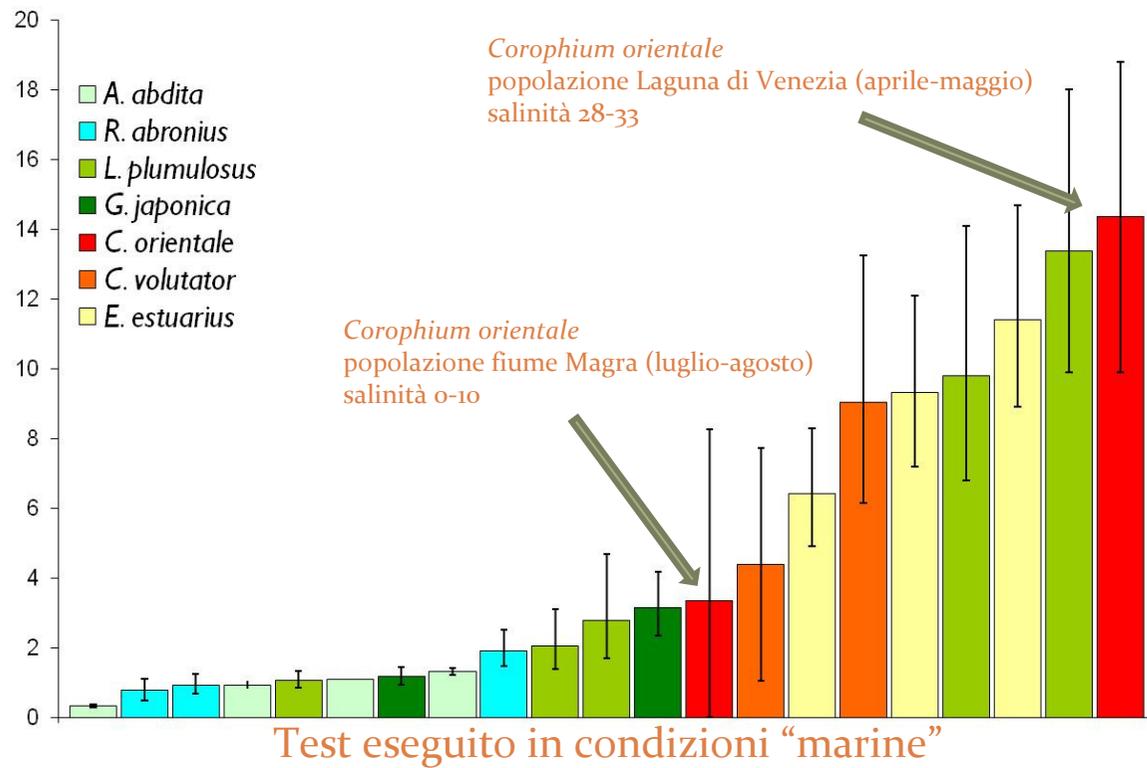
Una particolare specie può mostrare **differenze nella sua tolleranza ai tossici quando la salinità del mezzo cambia**

La variazione di S costringe l'organismo a mettere in atto delle strategie per mantenere il bilancio osmotico, generando un dispendio energetico che deve essere considerato una forma di stress

Gli organismi estuarini sono quelli maggiormente soggetti a questa forma di stress, in particolare in ambienti caratterizzati da elevate escursioni di salinità

Salinità

In generale, le specie eurialine mostrano la massima tolleranza e quindi capacità di resistere gli inquinanti in acque con salinità vicina al loro punto isosmotico (Sprague, 1995)





Parametri ambientali

La tossicità è funzione anche dei **fattori che regolano la biodisponibilità** dei contaminanti nelle acque, nei suoli e nei sedimenti

I fattori in causa sono i medesimi coinvolti nella limitazione del bioaccumulo, in particolare:

- **Chelanti e ligandi** in fase disciolta e particellata, che limitano l'adsorbimento e l'uptake via "acqua" (speciazione dei metalli)
- Fasi solide presenti nei sedimenti, in particolare **OC e AVS** che regolano la ripartizione dei contaminanti tra acque interstiziali e matrice solida



Caratteristiche degli organismi

Fattori che determinano variabilità *interspecifica*

la diversa sensibilità è definita **geneticamente** (presenza di recettori, vie di uptake e di trasporto e meccanismi di detossificazione), con differenze di sensibilità accentuate nel caso di organismi lontani nella scala evolutiva.

Fattori che determinano variabilità *intraspecifica*

la variabilità **genetica** e biologica (**età, sesso, stato di salute**) in un gruppo di individui della stessa specie determina una loro diversa risposta quantitativa ad una stessa concentrazione di tossico.



Caratteristiche degli organismi

Variabilità legata all'età

In molti crostacei l'età degli organismi (intesa come anzianità e non come diversa fase dello sviluppo embrio-larvale) influisce sulla risposta ai contaminanti

Individui senescenti tendono a essere più sensibili rispetto agli individui più giovani

Per evitare problemi legati all'effetto età, alcuni protocolli sperimentali prevedono la selezione di specifiche classi di taglia degli individui da utilizzare (come nel caso degli anfipodi)



Misura della tossicità

Come si misura la tossicità?

Gli effetti di un tossico si misurano mediante esperimenti (**test**) di laboratorio (o di campo) che prevedono l'esposizione degli organismi a contaminanti presenti in concentrazioni note (test su sostanze pure) o ignote (campioni ambientali) in acque, suoli o sedimenti

Cosa si misura?

L'**effetto**, ovvero il tipo di danno biologico o la funzione compromessa dalla presenza del tossico

La quantificazione dell'effetto, espressa come % di incidenza o % di effetto, è detta "**risposta**"



Misura della tossicità

In caso di **esposizione acuta**, gli effetti misurati comprendono:

- Mortalità
- Alterazione del tasso di respirazione
- Capacità di fecondazione (motilità spermatica)
- Attività metaboliche (bioluminescenza)

Si tratta di **risposte individuali** dei singoli individui o fasi del ciclo vitale (spermatozoi)

Il paradigma “tossicità acuta = misura della mortalità” è superato, la mortalità non è l'unico endpoint misurabile in test di tossicità acuta



Misura della tossicità

In caso di **esposizione sub-cronica**, gli effetti misurati possono comprendere:

- Crescita
- Sviluppo embrio-larvale
- Capacità riproduttiva (alghe)
- Adattamenti comportamentali

Anche in questo caso si tratta di **risposte individuali** dei singoli individui o fasi del ciclo vitale (larve ed embrioni)

La tossicità sub-cronica può prevedere delle misure di mortalità



Misura della tossicità

Per la **tossicità cronica**, gli effetti misurati possono essere relativi a *parametri individuali*, tra cui:

- crescita
- sviluppo embrio-larvale fino allo stadio di adulto riproduttivo
- capacità riproduttiva (produzione di prole per femmina)
- raggiungimento della maturità sessuale

almeno in via teorica, sono misurabili anche a parametri relativi a *dinamica di popolazione* (andamento demografico), di *comunità* (interazione tra specie) ed *ecosistemici* (interazioni globali)



Misura della tossicità

La misura della tossicità acuta, sub-cronica e cronica coinvolge scale temporali e spaziali diverse, quindi necessita di *disegni sperimentali diversi*

Test di *tossicità acuta e subcronica* coinvolgono una *singola specie*, misurano *effetti diretti* a livello di organismo e sono generalmente condotti *in laboratorio*

Sono procedure *semplici, veloci e riproducibili* in quanto il numero di variabili coinvolte è limitato (esposizione controllata), l'interpretazione dei risultati più immediata

La rilevanza ecologica è comunque bassa



Tossicità acuta

Obiettivo

Stimare il **range di concentrazione** di un contaminante o di una miscela di contaminanti (in fase acquosa o nei sedimenti) in grado di determinare una risposta (**endpoint**) precisa, facilmente osservabile e misurabile in condizioni di esposizione controllata (T, S, pH) in un campione di organismi (adulti) rappresentativo di una popolazione in un determinato intervallo di tempo

Si considerano i soli effetti che si manifestano **durante la durata del saggio** e non quelli che si manifestano a termine dell'esposizione controllata



Tossicità acuta

Alcune caratteristiche dei test acuti

- Test solo ed esclusivamente su **specie singola**
- Impiegano **specie rappresentative** per l'ambiente
- **Procedure standardizzate** a livello internazionale
- Utilizzati nella **classificazione della tossicità** di sostanze di nuova introduzione o rilevate nell'ambiente
- Impiegati per **valutare l'impatto** di immissioni puntiformi o accidentali (effluenti, scarichi industriali, percolati)



Tossicità acuta

Gli organismi utilizzati

Devono provenire da popolazioni allevate o naturali, stabulate in laboratorio per un determinato periodo di tempo

Devono essere manipolati seguendo un protocollo sperimentale standardizzato

Devono essere omogenei da un punto di vista **genetico** e **fisiologico** per minimizzare le differenze di risposta al tossico e rendere affidabili le stime dell'effetto (unica fonte di organismi)

Devono essere sani e non sottoposti a stress di alcun genere



Tossicità acuta

VALE ANCHE PER
TEST CRONICI E

Come avviene l'esposizione in fase acquosa?

- **Test statici:** gli organismi sono messi a contatto con il contaminante in fase acquosa e la soluzione non viene mai rinnovata (la concentrazione del tossico potrebbe cambiare nel corso del test)
- **Test statici con rinnovo:** la soluzione acquosa in cui sono esposti gli organismi viene rinnovata parzialmente o completamente durante il test
- **Test a flusso:** la soluzione viene mantenuta attiva con un flusso continuo o intermittente di soluzione (mantiene concentrazione costante ma genera grandi quantità di reflui)



Tossicità acuta

VALE ANCHE PER
TEST CRONICI E

Come avviene l'esposizione in fase solida?

- **Test su tal quale:** gli organismi sono esposti al solo sedimento/suolo naturale oggetto di monitoraggio
- **Test con spiking:** gli organismi sono esposti a sedimenti manipolati e contaminati artificialmente con quantità crescenti di sostanze tossiche
- **Test con diluizione:** gli organismi sono esposti a diluizioni crescenti del sedimento/suolo di interesse con un sedimento naturale pulito e non contaminato oppure con un substrato artificiale inerte



Tossicità acuta

Come determino la relazione concentrazione-effetto?

Un **numero noto** di organismi è esposto a una serie di concentrazioni crescenti di **contaminante** e ad un **controllo negativo** (trattamento senza contaminante).

Alla fine del periodo di esposizione si valuta il numero di organismi che ha fornito una risposta (mortalità o altro parametro sub-letale) e si determina la % di effetto per ogni concentrazione

VALE ANCHE PER
TEST CRONICI E



Tossicità acuta

Misura dell'effetto

Test il cui endpoint produce dati di **tipo quantale** (ad esempio mortalità o numero di larve che schiudono dall'uovo)

Concentrazione	n. organismi	n. morti	% effetto
Controllo	20	1	5
0.4 mg l ⁻¹	20	2	10
0.8 mg l ⁻¹	20	5	25
1.6 mg l ⁻¹	20	9	45
3.2 mg l ⁻¹	20	18	90
6.4 mg l ⁻¹	20	20	100

Tossicità acuta

Misura dell'effetto

Per test il cui endpoint produce dati di tipo continuo (ad esempio crescita) si rapporta la risposta alle varie concentrazioni con il risultato ottenuto nel controllo negativo (normalizzazione)

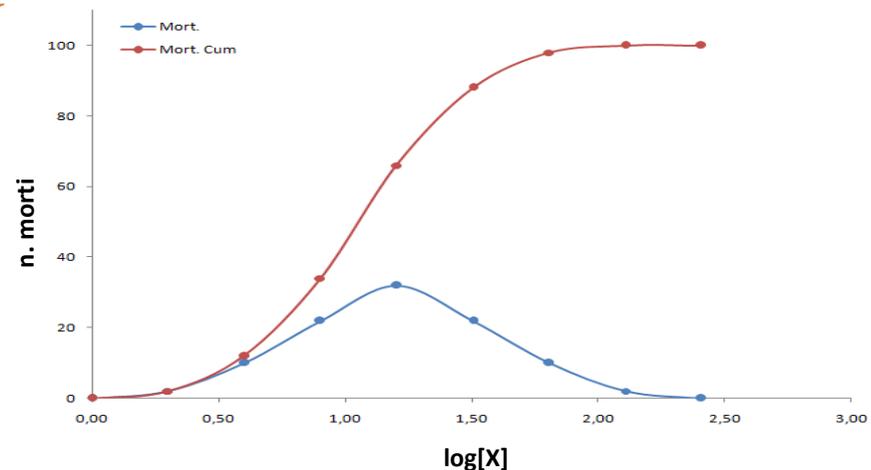
$$100 \times \left(1 - \frac{\text{lunghezza in concentrazione } x}{\text{lunghezza nel controllo}} \right)$$

Concentrazione	Lunghezza media	% effetto
Controllo	20 cm	-
0.4 mg l ⁻¹	18.3 cm	8.5
0.8 mg l ⁻¹	15.2 cm	24
1.6 mg l ⁻¹	2.1 cm	89.5

Relazione concentrazione effetto

La **curva cumulativa** tipica che si ottiene mettendo in relazione concentrazione $[x]$ ed effetto è una **curva sigmoide** (al netto di eventuali trasformazioni logaritmiche per aggiustare la scala), mentre la **distribuzione delle frequenze** di effetto rispetto a $[x]$ si approssima a **una normale**

[X]	log[X]	Mort.	Mort. Cum
1	0,00	0	0
2	0,30	2	2
4	0,60	10	12
8	0,90	22	34
16	1,20	32	66
32	1,51	22	88
64	1,81	10	98
128	2,11	2	100
256	2,41	0	100



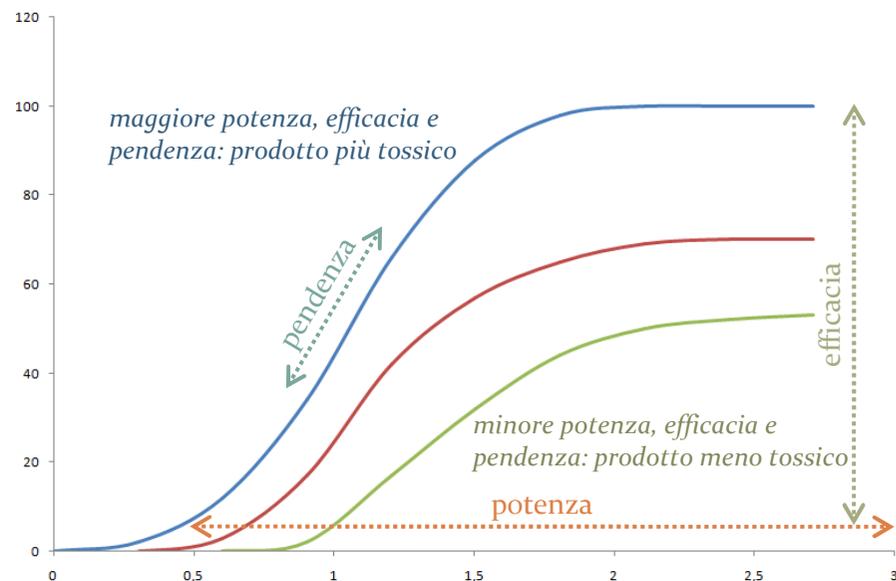
Relazione concentrazione effetto

La curva concentrazione-effetto ha delle caratteristiche tipiche che sono in funzione della sostanza

Pendenza: *variazione della risposta per unità di concentrazione*

Potenza: *posizione della curva rispetto all'asse della concentrazione*

Efficacia: *effetto massimo ottenibile*





Relazione concentrazione effetto

La distribuzione delle risposte è una **curva sigmoideale**, ma per il calcolo dei parametri di tossicità è necessario trasformare la curva

Le trasformazioni più utilizzate (tramite software) sono il **probit** (unità di probabilità), **logit** e la trasformata di **Weibull**, tutte portano alla **linearizzazione** della curva, che agevola il calcolo della “concentrazioni effettive” ovvero le concentrazioni che determinano effetto su una percentuale X di organismi esposti (generalmente il 50% o in alcuni casi il 20%)

Le più usate sono quindi LC₅₀ ed EC₅₀



Relazione concentrazione effetto

LC_{50} è utilizzato come parametro di riferimento perché tende ad essere valore più consistente e con minore incertezza associata rispetto ad altri dati (ad es. LC_{10}) che dal punto di vista della valutazione del rischio ambientale potrebbero avere una maggiore significatività biologica

Si tratta quindi di una scelta dettata da esigenze statistiche più che ambientali

LC_x possono essere calcolati con l'impiego di software e anche utilizzando i probits, tuttavia la stima di questi parametri è soggetta ad ampi intervalli di confidenza



Relazione concentrazione effetto

Oltre a LC_{50} sono stimabili altri parametri mediani secondo le medesime modalità:

- EC_{50} (Effective Concentration): si riferisce a effetti diversi dalla morte
- LD_{50} (Lethal Dose): si riferisce alla dose in saggi di tossicità alimentare (tossicologia classica)
- LT_{50} (Lethal Time 50): rappresenta il tempo necessario a determinare la morte del 50% degli individui di una popolazione esposta ad una data concentrazione di una sostanza (disegno sperimentale leggermente diverso)



Test di tossicità cronica

Perché sono importanti i test cronici?

- L'esposizione cronica a contaminanti è una condizione più frequente negli ambienti naturali rispetto all'esposizione acuta
- Ambienti moderatamente contaminati sono più comuni rispetto ad ambienti altamente contaminati
- Gli effetti subletali possono avere maggiore rilevanza ecologica rispetto agli effetti letali nell'identificare possibili scompensi legati all'esposizione a contaminanti



Test di tossicità cronica

Obiettivo

Determinare **la più bassa concentrazione** di contaminante in grado di provocare l'insorgere di effetti dannosi

Questa concentrazione rappresenta la base da utilizzare per la definizione di criteri di qualità e protezione ambientale

La relazione concentrazione-effetto si ricava esattamente nello stesso modo visto per i saggi acuti, tuttavia cambiano i parametri soglia utilizzati



Test di tossicità cronica

Parametri soglia

- **NOEL (No Observed Effect Level)**: rappresenta il più alto livello (concentrazione o dose) al quale non si è osservato alcun effetto. È sempre *riferito alle specifiche condizioni sperimentali* e non rappresenta un effettivo livello di sicurezza
- **LOEL (Lowest Observed Effect Level)**: rappresenta il più basso livello (concentrazione o dose) al quale si è osservato un effetto. Come il NOEL, è *sempre riferito alle specifiche condizioni sperimentali*
- **NOEC (No Observed Effect Concentration)**: Concentrazione massima non efficace



Test di tossicità cronica

Parametri soglia

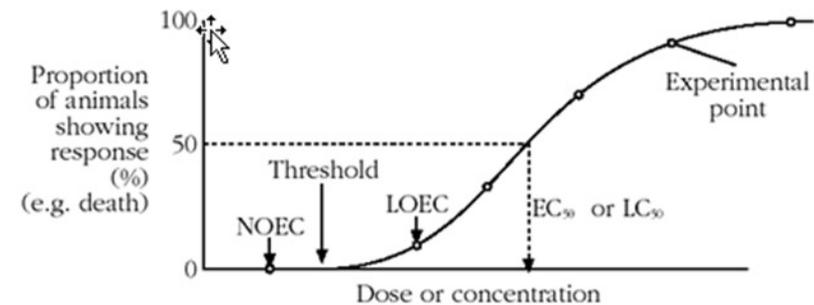
- **LOEC (Lowest Observed Effect Concentration):**
concentrazione minima efficace
- **MATC (Maximum Acceptable Toxicant Concentration):**
importante parametro soprattutto nell'ambito della definizione dei criteri di qualità, in quanto soglia di tossicità a lungo termine, compresa tra NOEC e LOEC, di cui spesso rappresenta la media geometrica

Test di tossicità cronica

NOEC, LOEC e tutti gli altri parametri calcolati per test cronici sono ricavati a seguito di analisi statistica (ANOVA e test post-hoc)

*sono delle **osservazioni dipendenti dal disegno sperimentale del saggio** eseguito e non parametri statistici indipendenti come LC/EC_{50}*

Se il disegno sperimentale non è ben strutturato, NOEC e LOEC potrebbero rivelarsi parametri non



Disegno sperimentale ideale, con NOEC e LOEC centrate sul punto di soglia

In test su sostanze di tossicità ignota può capitare che la scansione dei punti sperimentali non consenta di identificare con accuratezza il punto di soglia e che questo sia più o meno vicino a uno dei 2 parametri



Test di tossicità cronica

Ormesi

Effetto stimolatorio, generato dall'esposizione a concentrazioni molto basse (sub-inibitorie) di alcuni contaminanti

Calabrese (2008) ha definito l'ormesi come *“un fenomeno dose-risposta bifase, caratterizzato da una stimolazione a basso dosaggio e una inibizione ad alto dosaggio”*

La curva concentrazione risposta assume una caratteristica forma ad “U” o “J-shaped”

È una relazione generale, indipendente dal modello biologico, dall'endpoint misurato e dalla tipologia di tossico



Test di tossicità cronica

Questioni aperte relativamente all'ormesi

Non tutti gli esperimenti ecotossicologici hanno la capacità di rilevare ormesi in quanto si lavora con concentrazioni troppo elevate per rilevarla (stesso problema per incipienza)

È legata soprattutto a test cronici ma se ne riportano casi anche in test sub-cronici

L'ormesi potrebbe rivoluzionare l'approccio classico basato sulle relazioni dose-effetto in tossicologia ed ecotossicologia oltre che portare a una revisione dei criteri della ERA