

## Ecotossicologia

All'inizio degli anni '90 il limnologo Robert Peters attaccò duramente l'impostazione degli studi ecologici [1] perché, a suo parere, non erano sufficientemente quantitativi e predittivi e risultavano pertanto scarsamente applicabili per risolvere i problemi ambientali. Come esempi positivi di predittività Peters citava il modello di Vollenweider (Cap. 6) per il controllo dello stato trofico degli ambienti acquatici e i modelli messi a punto negli studi ecotossicologici.

Fu soprattutto la necessità di far fronte alla complessa problematica delle sostanze xenobiotiche, troppo numerose per poter essere valutate una per una in laboratorio, che spinse gli studi ecotossicologici nella direzione di un approccio ecosistemico di tipo modellistico e predittivo. Inizialmente **l'ecotossicologia**, termine coniato da René Truhaut nel 1969, era considerata una branca della tossicologia, rivolta a valutare gli effetti dei tossici non solo sull'uomo ma su tutti gli esseri viventi. Successivamente, gli studiosi si resero conto di quanto fosse importante valutare anche i livelli di esposizione ambientale dei potenziali tossici per individuare quelli che realmente potevano danneggiare gli ecosistemi. L'ecotossicologia intraprese così due percorsi complementari, il primo rivolto a misurare i livelli ambientali e a prevederli grazie alla messa a punto di modelli teorici, il secondo finalizzato alla misura e alla previsione degli effetti. Questi due percorsi si incontrano nella valutazione del rischio chimico per le singole specie, le comunità biologiche e gli ecosistemi nel loro complesso.

### **Modelli di distribuzione delle sostanze xenobiotiche**

Per costruire modelli che consentano di valutare il comportamento ambientale delle sostanze xenobiotiche è necessario prima di tutto comprendere i fenomeni che regolano il passaggio da un comparto all'altro di un ecosistema, dove per comparti si intendono le componenti solide degli ecosistemi (suolo, particolato sospeso nell'aria o nell'acqua, sedimenti), le acque (dolci, marine, salmastre), l'aria e la componente biologica (biota), schematizzati nella Figura 1.

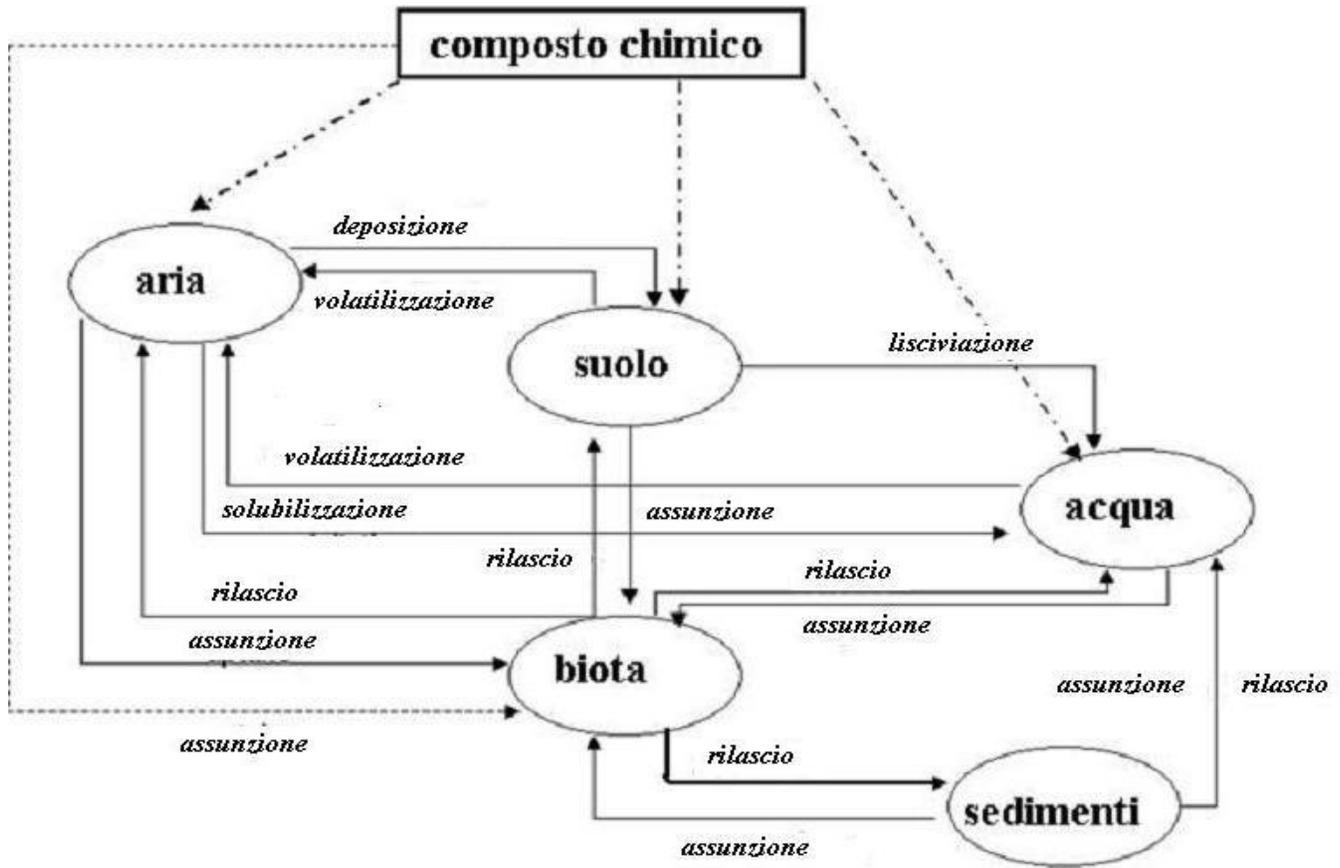


Fig. 1. Processi coinvolti nella distribuzione ambientale dei microinquinanti.

Le costanti di equilibrio bifasico, che determinano la ripartizione tra due compartimenti, sono:  $H_C$  (costante della legge di Henry), per gli scambi tra aria e acqua,  $K_{OC}$  (costante di ripartizione tra acqua e carbonio organico del suolo, per gli scambi tra suolo, sedimenti, solidi sospesi e acqua) e  $K_{OW}$  (costante di ripartizione tra acqua e n-ottanolo) per gli scambi tra acqua e biota.

Il n-ottanolo è un composto con una lunga catena lipofila e un'estremità polare che simula il comportamento dei lipidi dei tessuti animali, dove tendono ad accumularsi i microinquinanti organici poco solubili in acqua. La costante della legge di Henry ( $H_C$ ) è definita dal rapporto  $c_a/c_w$ , dove  $c_a$  rappresenta la concentrazione in aria e  $c_w$  quella nell'acqua in condizioni di equilibrio.  $H_C$  si può determinare sperimentalmente o si può calcolare conoscendo la tensione di vapore del composto e la sua solubilità in acqua.

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

Il trasferimento dall'acqua agli organismi, molto complesso dal punto di vista farmacocinetico, si può assimilare, nel caso in cui le trasformazioni metaboliche siano trascurabili, a un fenomeno di natura fisica che dipende dalla solubilità del composto nell'acqua e nel grasso dell'organismo. Il fattore di bioconcentrazione nei pesci (BCF) e negli altri organismi a respirazione branchiale, si riferisce all'assunzione di un composto direttamente dall'acqua ed è definito come il rapporto tra  $c_f$ , la concentrazione nei pesci e  $c_w$ , la concentrazione nell'acqua in condizioni di equilibrio. Questo rapporto tende a coincidere con il  $K_{OW}$  quando la concentrazione nei pesci viene riferita alla frazione lipidica. Analogamente, i microinquinanti organici poco solubili si concentrano nella sostanza organica presente nei suoli, nei solidi sospesi e nei sedimenti in funzione della loro idrofobicità. Il  $K_{OC}$ , coefficiente di ripartizione nel carbonio organico del suolo, risulta leggermente inferiore al  $K_{OW}$  e può essere calcolato usando la seguente relazione sperimentale [2]:

$$\text{Log } K_{OC} = \text{Log } K_{OW} - 0,21$$

All'inizio degli anni'80 il fisico canadese Donald Mackay, propose di accorpare in unico modello le principali componenti ambientali e i fenomeni che regolano i flussi delle molecole, proponendo il modello dell'Unità di Mondo (Fig.2) [3].

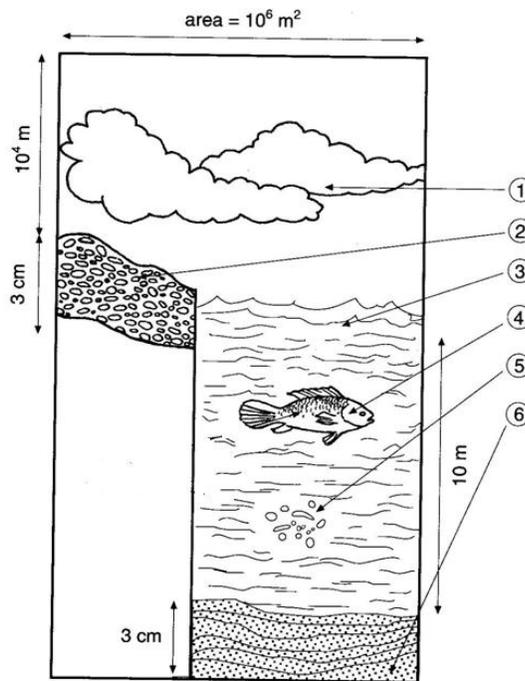


Fig. 2 Unità di mondo [3]. Volumi in  $\text{m}^3$ : 1 (aria)  $10^3$ ; 2 suolo  $9 \times 10^3$ ; 3 (acqua)  $7 \times 10^6$ ; 4 (biota) 3,5; 5 (solidi sospesi) 35; 6 (sedimento)  $10^4$

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

Le componenti di questo ecosistema, sono presenti approssimativamente nelle stesse proporzioni della Terra e i flussi da un comparto all'altro risultano regolati dagli scambi bifasici descritti nella fig.1. La tendenza di una molecola a lasciare una fase per trasferirsi in un'altra con la quale è in contatto viene chiamata fugacità e viene espressa in unità di pressione.

Questo modello, nella sua versione più semplice (livello 1), considera un sistema chiuso in situazione di equilibrio termodinamico tra tutti i comparti che si verifica quando le molecole, pur continuando a muoversi da un comparto all'altro, mantengono costante il rapporto tra le velocità di scambio.

Un livello di elaborazione leggermente più complesso (livello 2) considera una situazione dinamica in cui il sistema è aperto e il composto ha diverse vie di entrata e di uscita dal sistema, una delle quali è rappresentata dalle trasformazioni che possono avvenire sia per fenomeni fisici come la fotolisi e l'idrolisi sia per biodegradazione. In questo caso il sistema non raggiungerà mai l'equilibrio ma può raggiungere uno stato stazionario nel quale le concentrazioni nei diversi comparti restano stabili, come il livello dell'acqua in una vasca da bagno in cui le perdite sono compensate dall'acqua erogata dal rubinetto.

Il livello successivo (livello 3) considera la possibile distribuzione di un composto su scala regionale e richiede una serie di informazioni supplementari legate soprattutto alla particolare condizione climatica della zona considerata e alla proporzione dei comparti in gioco che possono differire da quelle dell'Unità di Mondo.

Per comprendere le potenzialità del modello di Mackay al livello 1, proviamo ad applicarlo a due pesticidi che hanno avuto un vasto impiego in tutto il mondo, l'insetticida pp'DDT e l'erbicida atrazina. Le loro proprietà, riportate nella tabella 1, mostrano immediatamente una notevole differenza di solubilità in acqua dei due composti: l'atrazina è molto più solubile e decisamente meno lipofila (basso  $K_{ow}$ ) del pp'DDT

Tabella 1 Proprietà necessarie per utilizzare il modello dell'Unità di mondo

	pp'DDT	Atrazina
Peso molecolare	354,5	215,7
Solubilità in acqua in $\text{g m}^{-3}$	0,0017	30
Tensione di vapore in Pa	$2,5 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$
Log $K_{ow}$	6,19	2,75

La ripartizione all'equilibrio nei diversi comparti ottenuta in seguito all'applicazione del modello dell'Unità di Mondo (Tabella 2), mostra che la maggior parte dell'atrazina si distribuisce principalmente in acqua giustificando la sua ampia diffusione nelle falde e nei fiumi delle zone dove è stata utilizzata per il diserbo del mais (Capitolo 6).

Tabella 2 Percentuali di distribuzione delle moli di pp'DDT e Atrazina nei comparti ambientali dell'Unità di mondo.

	pp'DDT	Atrazina
Aria	2,35	0,015
Suolo	17,1	0,85
Acqua	0,77	94,5
Pesci	0,0093	0,0032
Solidi sospesi	0,13	0,008
Sedimento	79,7	5,00

Al contrario, il pp'DDT viene sequestrato nei suoli e nei sedimenti e la percentuale presente in acqua è molto più bassa. La presenza di una frazione di DDT in aria consistente e più elevata di quella dell'atrazina spiega il suo trasporto per via aerea e la sua distribuzione su scala globale. La tendenza alla volatilizzazione di un composto dipende da  $H_C$  che risulta molto più elevata nel DDT rispetto all'atrazina ancora una volta a causa della sua minore solubilità in acqua.

La scarsa affinità del pp'DDT per l'acqua è anche la ragione del suo elevato potenziale di accumulo negli organismi acquatici che in questo modello vengono rappresentati dai pesci. Il modello dell'Unità di Mondo considera solo il trasferimento delle sostanze per assunzione diretta dall'acqua, cioè la bioconcentrazione e non la biomagnificazione attraverso le reti trofiche di cui parleremo in seguito.

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

In realtà studi ecotossicologici successivi, hanno dimostrato che la biomagnificazione assume un ruolo rilevante nel bioaccumulo negli ambienti acquatici per i composti che hanno un valore di  $\text{Log } K_{OW}$  superiore a 5,5 [4]. Sarebbe dunque trascurabile per l'atrazina ma non per il pp'DDT. Oltre a fornire indicazioni sui comparti che costituiscono il recapito preferenziale di una molecola xenobiotica, il modello dell'Unità di mondo consente di valutare le concentrazioni in ogni singolo comparto. Conoscendo la ripartizione percentuale delle moli (Tabella 2), il peso molecolare del composto e i volumi dei comparti, le concentrazioni molari possono essere calcolate semplicemente dividendo le moli per il volume del comparto stesso e quelle in  $\text{mg L}^{-1}$  moltiplicando queste ultime per il peso molecolare..

In questo modo potremmo valutare se la concentrazione se il DDT accumulato nei pesci può mettere a rischio la loro capacità riproduttiva o renderli non idonei per l'uso alimentare umano. Va detto, tuttavia, che per ottenere risposte di questo tipo il modello andrebbe applicato su scala regionale conoscendo le quantità immesse nell'ambiente. Il modello di base è molto utile soprattutto dal punto di vista didattico per confrontare il comportamento ambientale di diverse molecole di sintesi.

Dagli anni '80 ad oggi i modelli basati sul concetto di fugacità si sono notevolmente evoluti permettendo di formulare in alcuni casi un bilancio di massa abbastanza realistico per ecosistemi acquatici in cui i contaminanti hanno raggiunto una situazione stazionaria. Per approfondimenti sui modelli di fugacità è possibile consultare il sito web dell'università di Trent in Canada [5].

Modelli previsionali di questo tipo sono stati inseriti nelle procedure del REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances), un regolamento varato dalla Comunità europea nel 2006 per aumentare il livello di protezione per l'uomo e gli altri esseri viventi dal rischio chimico (Approfondimento 7.1).

## Misura degli effetti

Gli effetti di un agente chimico possono essere misurati a partire dal livello molecolare fino a quello di ecosistema seguendo la scala gerarchica di cellula, organo, individuo, popolazione, comunità, ecosistema. L'ecotossicologia sperimentale considerò, inizialmente, soprattutto gli ecosistemi acquatici che più vistosamente subirono gli effetti negativi dell'inquinamento. Le specie da utilizzare in ecotossicologia acquatica furono selezionate in funzione della loro rappresentatività degli ecosistemi di provenienza, dell'appartenenza ai diversi livelli trofici e della reperibilità e/o facilità di mantenimento e allevamento. In particolare vennero messi a punto saggi con alghe d'acqua dolce, piccoli crostacei come *Daphnia magna* e pesci d'acquario. Successivamente furono messi a punto saggi per organismi rappresentativi dell'ecosistema suolo e per alcune specie rappresentative dell'avifauna e degli insetti impollinatori. Per i suoli i saggi più accreditati sono quelli su alcune specie vegetali terrestri (generalmente si utilizza il test di germinazione e allungamento radicale) e sul lombrico (*Eisenia fetida*). Per la valutazione della pericolosità dei pesticidi sono richiesti anche saggi sulle api e uccelli d'allevamento come la quaglia.

Per la valutazione della di mutagenicità e clastogenicità di una molecola si utilizzano batteri, come nel caso della dell'SOS Chromotest che utilizza il ceppo PQ37 di *Escherichia coli* nel quale il meccanismo di riparo SOS del danno al DNA viene misurato colorimetricamente o il test di Ames [6] con *Salmonella typhimurium*. Quest'ultimo si basa sulla misura del potenziale mutageno di una sostanza che si esplica provocando retro-mutazioni in un ceppo mutato di *Salmonella typhimurium* che ha perso la capacità di crescere in un terreno privo dell'amminoacido essenziale istidina. Le cellule esposte alla sostanza mutagena formano colonie molto più numerose rispetto ai controlli nei quali le retro-mutazioni spontanee sono casuali e molto meno frequenti di quelle provocate dalla sostanza mutagena.

Esistono molti altri saggi di questo tipo, alcuni dei quali utilizzano piante che, avendo cromosomi di grosse dimensioni, consentono un'osservazione più agevole delle aberrazioni cromosomiche indotte da sostanze genotossiche. L'ecotossicologia molecolare si sta sviluppando notevolmente allo scopo di chiarire le interazioni tra sostanze chimiche e organismi a livello biochimico e cellulare per individuare biomarker sensibili che consentano di evidenziare precocemente i primi segnali di esposizione agli inquinanti. Va osservato, in ogni caso, che gli effetti misurati a livello di singola specie e, a maggior ragione, a livello molecolare, vanno considerati soprattutto come utili strumenti

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

diagnostici per una prima valutazione del comportamento delle molecole di sintesi mentre presentano uno scarso realismo ecologico (Fig.3).

La realizzazione di "batterie" di saggi su più specie rappresenta il compromesso più valido per valutare gli effetti delle sostanze; i saggi su ecosistemi, che sarebbero più realistici dal punto di vista ecologico, risultano, infatti, difficili da realizzare e da interpretare.

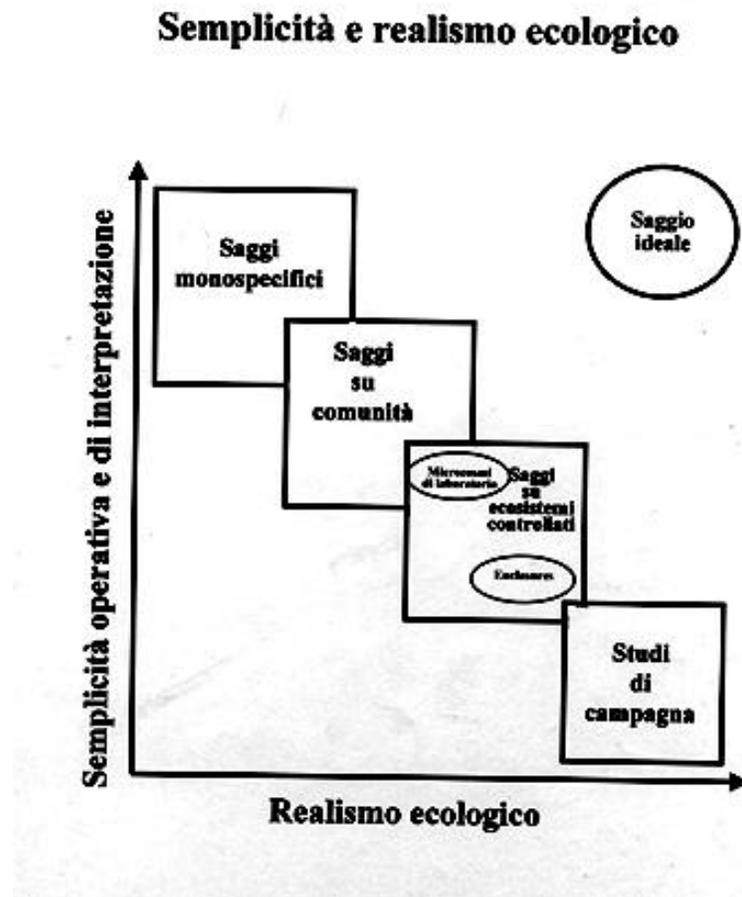


Fig. 3 Confronto tra semplicità operativa e realismo ecologico dei saggi ecotossicologici

I saggi ecotossicologici possono essere eseguiti sia per misurare effetti acuti, solitamente la mortalità, sia quelli cronici che si possono osservare direttamente sugli individui esposti o trattati sia sulle generazioni successive. I saggi cronici più utilizzati in ecotossicologia acquatica misurano la riduzione della fertilità di *Daphnia magna* e l'inibizione della crescita dell'alga verde *Selenastrum capricornutum*, ribattezzata in seguito *Pseudokirchneriella subcapitata* [6].

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

Anche i saggi di genotossicità sono da considerare cronici perché i danni prodotti sul DNA possono manifestarsi durante lo sviluppo dell'organismo ed essere trasmessi alle generazioni successive. *Daphnia magna* (Fig. 4) è in assoluto l'organismo più utilizzato in ecotossicologia acquatica perché può essere allevata in laboratorio in cloni uniformi dal punto di vista genetico. Ha, inoltre, un ciclo vitale relativamente breve, che consente di osservare gli effetti dell'esposizione delle madri sulla generazione successiva a quella esposta e presenta una stabilità genetica elevata se l'allevamento viene fatto in condizioni che garantiscono la riproduzione partenogenetica di un singolo clone.



Fig. 4 Esemplare adulto di *Daphnia magna* in cui si vedono le uova dalle quali nasceranno i piccoli dafnidi (Wikipedia)

Gli end-point ecotossicologici che più frequentemente vengono utilizzati per quantificare gli effetti di una sostanza sono la LD50 e la LC50, che rappresentano rispettivamente la dose e la concentrazione letali al 50% degli individui, la NOEL (No-Observed-Effect Level) che corrisponde alla dose o alla concentrazione più elevata utilizzata durante la conduzione di un saggio che non ha determinato effetti negativi e la LOEL (Lowest-Observed-Effect Level) che corrisponde al minimo dosaggio o alla minima concentrazione alla quale si è osservato un effetto negativo.

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

I dati di mortalità sono tipo quantale (tutto o nulla) e richiedono di essere elaborati col modello probit (unità di probabilità) di cui portiamo un esempio per chiarire come si differenzia dalle comuni analisi statistiche usate per elaborare i dati di tipo continuo (peso, lunghezza, altezza) che vengono solitamente analizzati nella sperimentazione biologica.

Supponiamo di avere una sostanza cristallina con una buona solubilità in acqua di cui si voglia misurare la tossicità acuta su *Daphnia magna*, solitamente determinata con un tempo di esposizione di 24 o 48 ore.

Per prima cosa sarà necessario trovare il range di tossicità esponendo un certo numero di dafnidi non più vecchi di 24 ore a concentrazioni di sostanza decrescenti in serie logaritmica (100;10;1;0,1..). Se alla concentrazione di 100 mg L<sup>-1</sup> si è osservata mortalità del 100% degli individui a 24 ore e a 10 mg L<sup>-1</sup> non si è osservata alcuna mortalità, il saggio definitivo verrà allestito in un ambito di concentrazioni compreso tra 100 e 10 mgL<sup>-1</sup>, osservando intervalli logaritmici di concentrazione. Se si decide di utilizzare cinque diluizioni, per avere una buona probabilità di osservare percentuali di mortalità intermedie, l'intervallo logaritmico tra una concentrazione e l'altra può essere calcolato con la formula seguente:

$$(\text{Log } 100 - \text{Log } 10) / 4 = 0,25$$

La concentrazione più bassa corrisponderà a quella di non effetto (10 mg L<sup>-1</sup>), la seconda all'antilogaritmo di 1,25 mgL<sup>-1</sup>, la terza all'antilogaritmi di 1,5 e così via. I risultati di questo ipotetico saggio in cui dieci dafnidi sono stati esposti alle concentrazioni di tossico così selezionate sono esposti nella Tabella 3.

Tabella 3. Risultati di un saggio acuto su *Daphnia magna*

Concentrazione in mg L <sup>-1</sup>	Numero di immobili a 24 ore	%
10	0/10	0
17,8	1/10	10
31,6	4/10	40
56,2	6/10	60
100	10/10	100

Va precisato che nel saggio di tossicità con *Daphnia magna* è difficile valutare la morte degli individui e si considera l'immobilità come end point tossicologico. La 24h IC50 su *Daphnia magna* (immobilizzazione del 50% degli organismi) risulta evidentemente compresa tra 31,6 e 56,2 mg L<sup>-1</sup>. Per trovare il valore esatto si deve utilizzare uno dei programmi disponibili per personal computer basato sul modello probit che consentono di ricavare anche i limiti fiduciali dell'IC50. Per ricavare manualmente questo dato si può utilizzare una carta Log-probit (Fig.5).

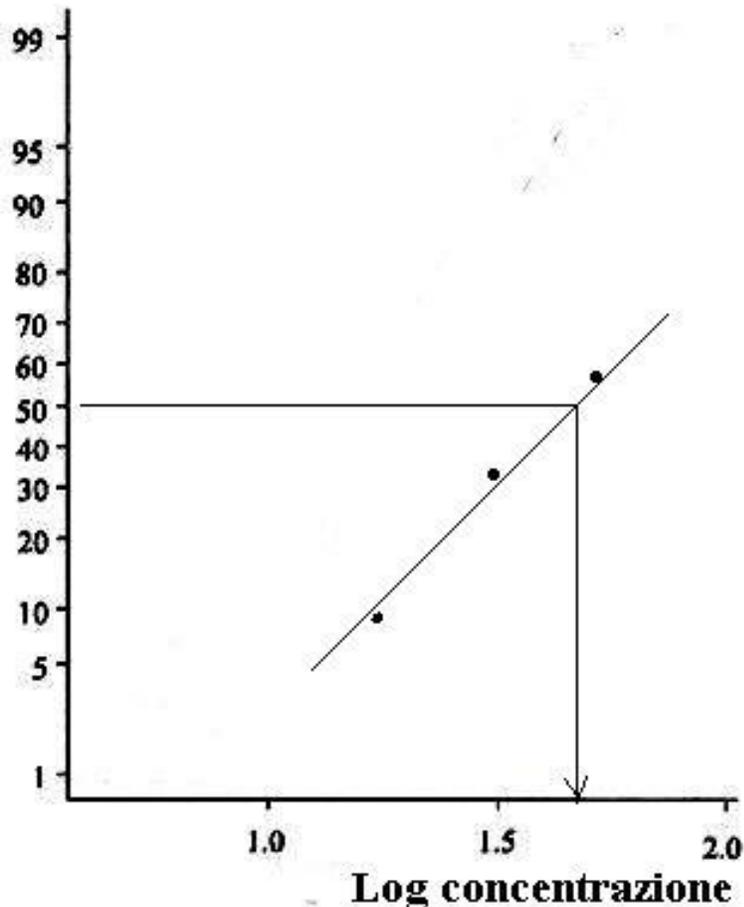


Fig.5 Risultati in scala Log-probit

I logaritmi delle concentrazioni di esposizione vengono riportati sull'asse delle ascisse mentre le percentuali delle risposte vengono riportate sulla scala delle ordinate che è una scala di probabilità con intervalli di valori simmetrici rispetto a quello centrale del 50%. Nel nostro esempio la 24h IC50 risulta pari a 1,66 come valore logaritmico che corrisponde a 45,7 mg L<sup>-1</sup>. Nella scala probit le percentuali che si allontanano dal 50% sono più spaziate perché tengono conto dell'andamento gaussiano dei caratteri di un individuo nell'ambito di una popolazione (Fig.6). La sensibilità ai tossici è condizionata, ad esempio, dall'età e dalle dimensioni degli

individui sottoposti al saggio che non possono essere identiche anche se i dafnidi sono stati generati in un intervallo abbastanza ristretto di tempo.

La distribuzione gaussiana della sensibilità al tossico determina un andamento non lineare delle risposte cumulative che vengono osservate nel saggio di tossicità che assume una forma ad esse (Fig.6). Le risposte osservate sono cumulative perché per ogni concentrazione di esposizione vengono contati gli individui che hanno subito l'effetto più quelli che lo avrebbero subito a concentrazioni inferiori.

La scala probit consente in un certo senso di "stirare" la curva ad esse delle risposte cumulative grazie alla maggiore spaziatura degli intervalli di concentrazione vicini ai valori massimi e minimi.

Si noti che la carta probit non parte da zero e non arriva a 100 perché non è possibile individuare sperimentalmente la concentrazione non dà effetto e quella che immobilizza tutte le dafnie. Una concentrazione di poco più bassa di quella massima utilizzata potrebbe produrre lo stesso effetto e una concentrazione leggermente più alta della minima potrebbe risultare ancora innocua.

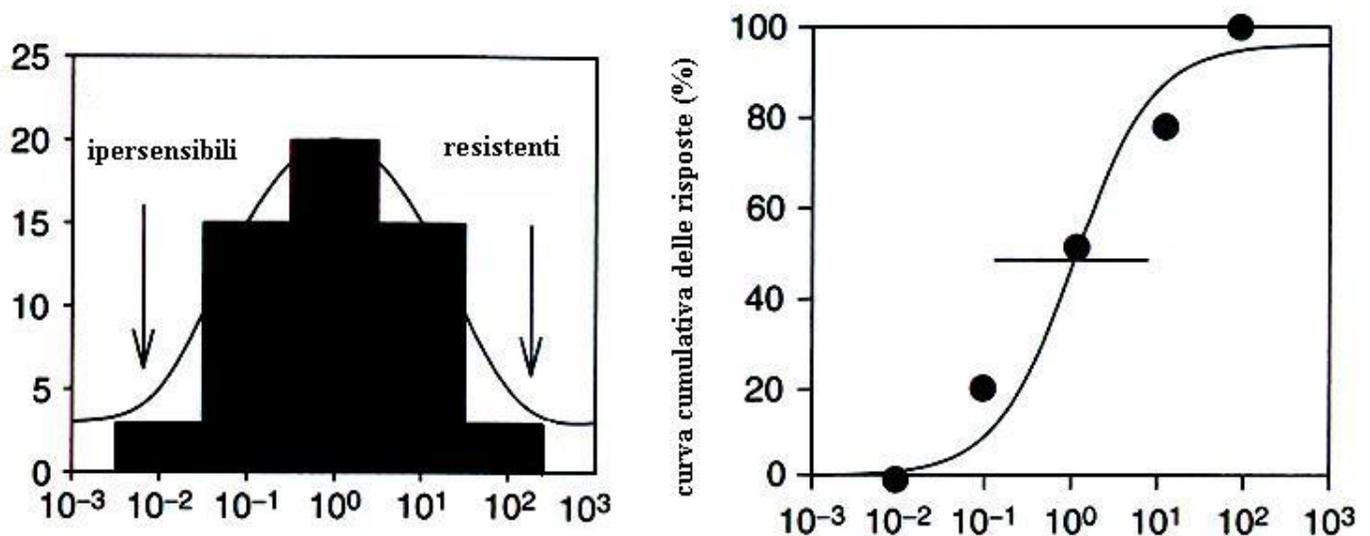


Fig.6 Gaussiana della sensibilità (a sinistra) e curva cumulativa delle risposte (a destra).

Il tempo di esposizione influisce sui risultati di un saggio. A parità di concentrazione il numero di immobili aumenta prolungando il tempo di esposizione. Quando si confrontano dati di tossicità acuta è sempre necessario riferirsi a dati ottenuti con stesso tempo di esposizione. Nel caso di *Daphnia magna* non è possibile condurre saggi acuti di durata superiore a 48 ore perché i protocolli prevedono che gli organismi non siano alimentati durante l'esposizione e i dafnidi non sopportano digiuni troppo prolungati.

## Previsione degli effetti

E' facile immaginare quanto possa risultare oneroso sperimentare in laboratorio gli effetti delle decine di migliaia di composti chimici già presenti sul mercato e quanto sia auspicabile disporre di modelli che permettano di generalizzare il comportamento di intere categorie di sostanze sulla base di un numero limitato di risultati ottenuti in laboratorio. Questo approccio è stato sempre sostenuto dalle industrie dei fitofarmaci e di altre molecole di sintesi perchè è poco costoso e consente di ottenere a tavolino risultati che in laboratorio possono richiedere anni di sperimentazione. Incontra anche il favore di chi si oppone alla sperimentazione su esseri viventi. I primi modelli utilizzarono come descrittore molecolare il  $K_{OW}$  che fornisce indicazioni sulla potenzialità di una molecola organica a superare la membrana fosfolipidica delle cellule e ad accumularsi al loro interno.

In uno studio pioneristico condotto in laboratori italiani negli anni '80 sono state trovate relazioni lineari tra il logaritmo della concentrazione tossica e il logaritmo del  $K_{OW}$  per diversi organismi acquatici [7]. Relazioni analoghe sono state confermate per altri composti poco polari il cui principale meccanismo d'azione è la narcosi (Tabella 5) [8].

Tabella 5. QSAR ottenute in saggi di ecotossicologia acquatica con composti poco polari.

Species	Endpoint	Equation + statistics	Reference
<b>Fish</b>			
<i>Pimephales promelas</i>	96-h LC50 mol · l <sup>-1</sup>	log LC50 = -0.85 logKow - 1.39 n=58, r <sup>2</sup> =0.94, Q <sup>2</sup> =0.93, s.e.=0.36	Verhaar et al., 1995
<i>Brachydanio rerio</i> <i>P. promelas</i>	28-32-d NOEC ELS test, mol · l <sup>-1</sup>	log NOEC = -0.90 logKow - 2.30 n=27, r <sup>2</sup> =0.92, Q <sup>2</sup> =0.91, s.e.=0.33	Verhaar et al., 1995
<b>Daphnia</b>			
<i>Daphnia magna</i>	48-h EC50 immobilis. mol · l <sup>-1</sup>	log EC50 = -0.95 logKow - 1.32 n=49, r <sup>2</sup> =0.95, Q <sup>2</sup> =0.94, s.e.=0.34	Verhaar et al., 1995
<i>Daphnia magna</i>	16-d NOEC, growth, reproduct. mol · l <sup>-1</sup>	log NOEC = -1.05 logKow - 1.85 n=10, r <sup>2</sup> =0.97, Q <sup>2</sup> =0.95, s.e.=0.39	Verhaar et al., 1995
<b>Algae</b>			
<i>Selenastrum capricornutum</i>	72-96-h EC50 growth, mol · l <sup>-1</sup>	log EC50 = -1.00 logKow - 1.23 n=10, r <sup>2</sup> =0.93, Q <sup>2</sup> =n.d., s.e.=0.17	Van Leeuwen et al., 1992

n is the number of data, r<sup>2</sup> is the correlation coefficient, Q<sup>2</sup> is the cross-validated r<sup>2</sup> and s.e. is the standard error of estimate.

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

Se una molecola ha un effetto tossico specifico, oltre a quello narcotico, come nel caso dei pesticidi fosforati o delle aflatossine, la tossicità si manifesta a concentrazioni molto inferiori a quelle che potremmo ottenere con le relazioni mostrate della tabella 5. Nel caso di molecole complesse, quindi, il solo  $K_{OW}$  non può essere considerato un descrittore molecolare adeguato. Per questo la modellistica ecotossicologica si è evoluta a partire dalle semplici relazioni pubblicate negli anni '80 sviluppando modelli predittivi di tipo QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) [9] che utilizzano altri descrittori molecolari, calcolati con programmi di chemiometria.

Il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua resta comunque un descrittore importante per gli studi ecotossicologici perché consente di valutare il potenziale di bioaccumulo di una molecola negli organismi.

Mentre il fenomeno della bioconcentrazione negli organismi acquatici a respirazione branchiale avviene per scambio diretto con il mezzo acquoso, il passaggio da un organismo all'altro nell'ambito delle comunità biologiche si basa su un principio fondamentale dell'ecologia di base, quello del flusso dell'energia negli ecosistemi. Salendo dalla base della piramide alimentare, in cui si collocano i produttori, ai consumatori e ai predatori, la biomassa diminuisce, in quanto parte della materia viene trasformata in energia. Le sostanze persistenti e scarsamente metabolizzabili si concentrano sempre più dando luogo a una piramide rovesciata delle concentrazioni ( Fig.7). In un ecosistema acquatico, supponendo che il pp'DDT sia presente in acqua alla concentrazione di 3 ng L<sup>-1</sup>, potrebbe concentrarsi negli uccelli predatori e nelle loro uova più di 8 milioni di volte raggiungendo una concentrazione di 25 mg L<sup>-1</sup>. In realtà il pp'DDT viene in parte metabolizzato, soprattutto dagli animali a sangue caldo, ma il suo principale metabolita, il pp'DDE, è anch'esso accumulabile e risulta anche più nocivo del composto di partenza perché agisce da distruttore endocrino e diminuisce la fertilità dei predatori. Il declino delle popolazioni di alcuni uccelli predatori si verificò a causa dell'azione del pp'DDE, sul sistema riproduttivo perché questo composto determina l'assottigliamento del guscio delle uova e la schiusa prematura.

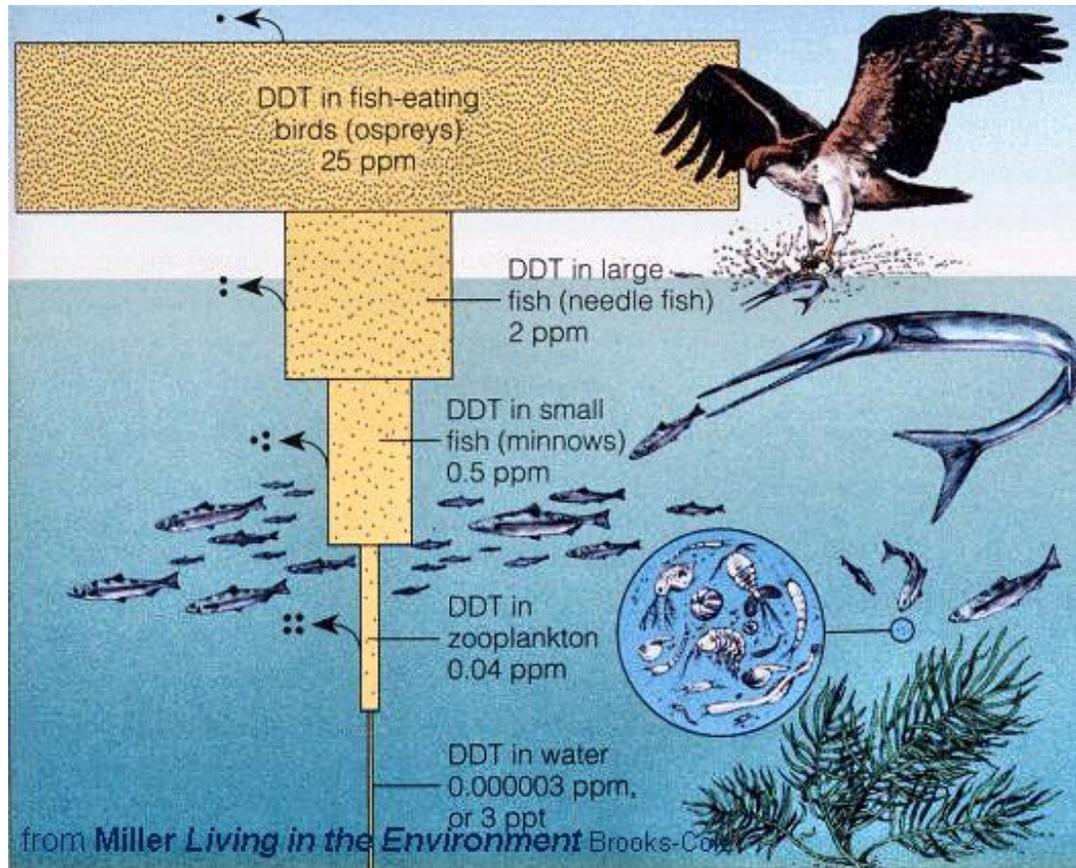


Fig.7 Bioaccumulo del DDT (Crediti:www.geo.arizona.edu)

## La valutazione del rischio ecologico

Per valutare il rischio determinato dalla diffusione di una sostanza potenzialmente pericolosa a livello ecosistemico si debbono considerare non solo gli effetti sulle singole specie ma anche le interrelazioni a livello di comunità e le condizioni dell'habitat. Per trasferirne i risultati ottenuti in laboratorio sugli ecosistemi reali è necessario disporre di solide conoscenze dell'ecologia di base e di come gli organismi interagiscono tra loro in natura e con le componenti abiotiche dell'ecosistema.

L'effetto di una sostanza si può manifestare ad ogni livello di organizzazione biologica in modo differente in funzione delle condizioni fisiche e chimiche dell'ecosistema e della sensibilità delle singole specie. Un ecosistema polare o di alta quota risulta, ad esempio, molto più sensibile ai POP (Persistent Organic Pollutant) di quelli dei climi temperati. Le ragioni sono molteplici, legate sia alle condizioni dell'habitat che alla struttura delle comunità e alla fisiologia delle singole specie: le basse temperature e la scarsità o assenza di suolo utile ai fini della degradazione prolungano i tempi di permanenza dei composti mentre l'esistenza di

reti trofiche piuttosto semplificate aumenta la probabilità di colpire specie chiave. I predatori terminali, inoltre, utilizzano l'accumulo di grassi come strategia di sopravvivenza e i tossici accumulati nei grassi di riserva vengono trasferiti alla prole durante l'allattamento nel caso dei mammiferi. Per tutti questi motivi le regioni polari e quelle d'alta quota sono molto vulnerabili ai POP prodotti nelle aree antropizzate come i pesticidi clorurati, i policlorodifenili, i polibromodifenileteri e altri composti di più recente produzione.

Dal punto di vista scientifico la previsione del rischio rappresenta quindi un problema di soluzione molto ardua perché presuppone la conoscenza di molte variabili dell'ecosistema, che mutano continuamente nel tempo e nello spazio. Un aspetto cruciale dell'applicazione delle conoscenze dell'ecotossicologia alla protezione ambientale consiste nella valutazione dei margini di sicurezza con i quali il rischio viene calcolato. Le procedure di definizione del rischio chimico si basano attualmente sul confronto della concentrazione di esposizione, determinata con modelli predittivi (PEC = Predicted Environmental Concentration) nel caso in cui non si disponga di analisi ambientali, con quella che non produce effetti negativi (PNEC = Predicted No-Effect Concentration) su organismi sottoposti a saggi di laboratorio (Fig.8).

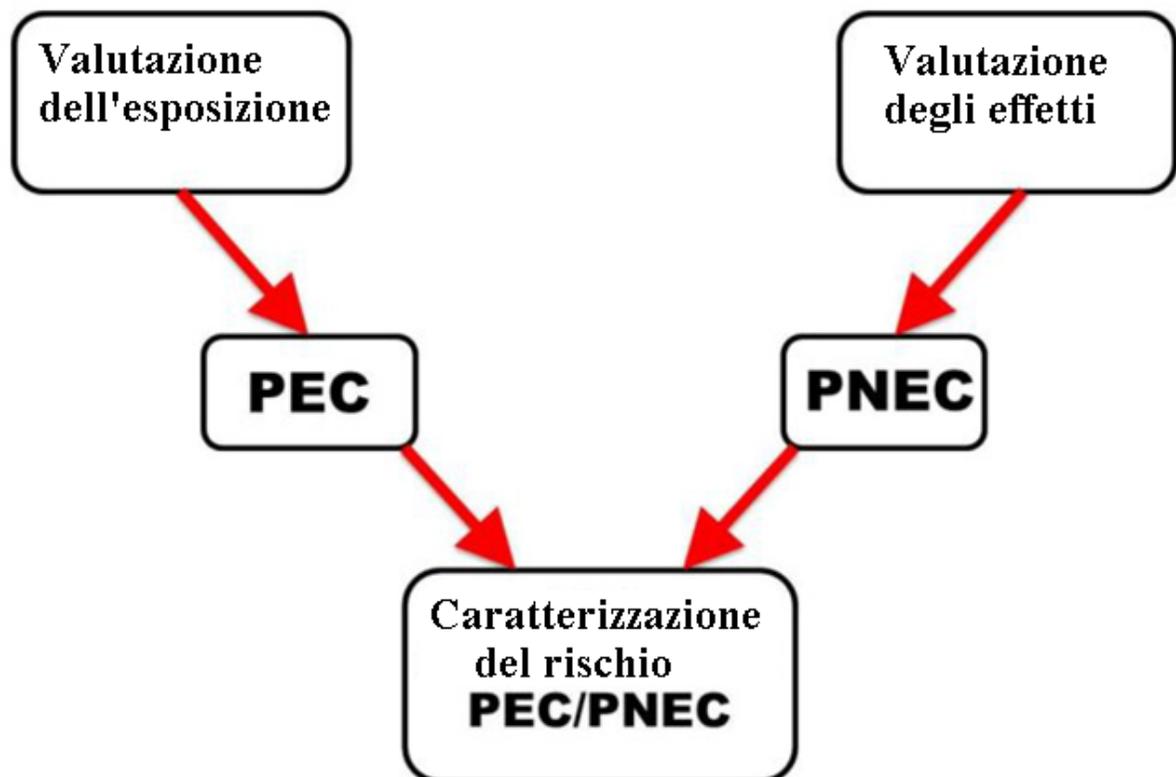


Fig.8 Schema di caratterizzazione del rischio chimico

S. Galassi, I. Ferrari, P. Viaroli, *Introduzione all'ecologia applicata. Dalla teoria alla pratica della sostenibilità*, Città Studi, 2014.

Generalmente la PEC viene calcolata con modelli a scala regionale in cui si considera una quantità di sostanza immessa nell'ambiente, definita in base agli usi, e la PNEC sui dati ottenuti conducendo saggi cronici e considerando la specie più sensibile. Si considera accettabile un rischio che corrisponda ad una situazione in cui PEC sia inferiore di 10, 100 o 1000 volte rispetto al PNEC. L'adozione di un fattore di riduzione più o meno elevato dipende dall'abbondanza dei dati ecotossicologici a disposizione e dalla persistenza e bioaccumulabilità del composto.

L'analisi del rischio rappresenta dunque un calcolo probabilistico basato su valori numerici sperimentali o sui risultanti dell'applicazione di modelli predittivi ed è ben diversa dalla percezione del rischio, che è del tutto soggettiva e andrebbe meglio definita come percezione del pericolo. Per chiarire il significato di rischio e pericolo in ecotossicologia può essere utile utilizzare il confronto tra la condizione di una tigre chiusa in gabbia e di quella in libertà. Lo spettatore esterno che osserva l'animale in gabbia non corre alcun rischio sebbene l'animale sia pericoloso. Il rischio diventa reale se la gabbia viene aperta permettendo all'animale di assalire lo spettatore. Analogamente, non è la sintesi di nuove molecole a costituire un rischio per gli ecosistemi, ma la loro diffusione, avvenuta in passato con poca o nessuna attenzione per gli esseri viventi e tuttora praticata disponendo di conoscenze limitate sul funzionamento degli ecosistemi.

1 Peters R.H. A Critique for Ecology 1991 Cambridge University Press. 366 pagg

2 Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A. (1979) Sorption of hydrophobic organic pollutants on natural sediments. *Wat.Res.*, 13, 241-248.

3 Mackay D., Peterson S. Calculating fugacity. *Environ. Sci.Technol.*, 15, 1006-1014. 1981

4 Connolly, J.P., and Pedersen, C.J. 1988. A thermodynamic evaluation of organic chemical accumulation in aquatic organisms. *Environ. Sci. Technol.* 22: 99-103.

5 <http://www.trentu.ca/academic/aminss/envmodel/models/L1L2L3.html>

6 Bruce N. Ames, Frank D. Lee, William E. Durston, An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens in *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 70, n° 3, 1° marzo 1973, pp. 782-786, DOI:10.1073/pnas.70.3.782, PMID 4577135, PMC 433358. 7 Calamari D, Galassi S, Setti F, Vighi M Toxicity of selected chlorobenzenes to aquatic organisms. *Chemosphere*, 12, 253-262 (1983)

8. Technical Guidance Document on Risk Assessment of European Commission.

[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_activities/public-health/risk\\_assessment\\_of\\_Biocides/doc/tgd](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/public-health/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd)

9 Gramatica, P (2007) Principles of QSAR models validation: internal and external, *QSAR Comb.Sci.* 26(5), 694-701.