



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
Sede di Firenze



RELAZIONE SCIENTIFICA SUI RISULTATI DELLA RICERCA SVOLTA

Titolo del programma di STM: GROUNDWATER ECOTOSSICOLOGICAL RISK ASSESSMENT: THE USE OF CRUSTACEANS

Il fruitore: TIZIANA DI LORENZO

Istituto di afferenza: CNR-ISE DI SESTO FIORENTINO con qualifica RICERCATORE livello III

Dipartimento di afferenza: SCIENZE DEL SISTEMA TERRA E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

Istituzione ospitante: IMDEA AGUA (<http://www.water.imdea.org/>) di Madrid, Spagna

Periodo di svolgimento del programma (durata del soggiorno): 17 Ottobre 2016 – 7 Novembre 2016

Obiettivi del programma

Gli obiettivi del programma di SMT, svolto dalla sottoscritta Tiziana Di Lorenzo, sono stati due. Il primo obiettivo è stato quello di effettuare test ecotossicologici acuti con contaminanti emergenti, tra i quali i composti farmaceutici per la salute umana, su crostacei copepodi presso i laboratori dell'IMDEA AGUA di Madrid. Il secondo obiettivo fissato è stato quello di sintetizzare i risultati ottenuti e stabilire la scaletta di pubblicazione e disseminazione.

Nello specifico, era stato previsto che, nel periodo di permanenza presso i laboratori dell'IMDEA, la sottoscritta avrebbe svolto le seguenti attività:

1. presentazione e discussione del protocollo ecotossicologico e programmazione dei test;
2. realizzazione dei test con crostacei dulciacquicoli afferenti al taxon COPEPODA:
 - a. preparazione delle concentrazioni da testare con alcune delle seguenti sostanze: caffeina, paracetamolo, ibuprofene, propanololo, adenololo, codeina, famotidina, salbutamolo (da 4 a 8 test in acuto);
 - b. preparazione ed esposizione degli animali;
 - c. raccolta dei risultati;
3. analisi statistiche dei dati ottenuti;
4. discussione dei risultati;

Sede operativa:

Via Madonna del Piano, 10 50019 SESTO FIORENTINO (FI) Tel. +39 0555225983 Fax: +039 0555225920

Sede principale:

Largo Tonolli, 50 28922 VERBANIA PALLANZA (VB) Tel. +39 0323 518300 Fax: +39 0323 556513



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
Sede di Firenze



5. discussione per stabilire la scaletta di pubblicazione e disseminazione degli stessi.

Risultati

Con le sue circa 11.000 specie note, il taxon Copepoda rappresenta il gruppo tassonomico dominante gli ambienti di acqua sotterranea. Numerosi studi di campo hanno evidenziato che tale taxon risponde agli impatti antropici, ma fino ad oggi non sono mai state testate le tossicità di contaminanti emergenti come i composti farmaceutici (CF), che si rinvencono sempre più frequentemente nei corpi idrici sotterranei. Gli studi ecotossicologici con copepodi stigobi ad oggi sono esclusivamente tre, uno dei quali pubblicato dalla sottoscritta (*Di Lorenzo et al., 2014. Sensitivity of hypogean and epigeal freshwater copepods to agricultural pollutants. Environmental Science and Pollution Research, doi 10.1007/s11356-013-2390-6*). Tale scarsità è dovuta alla difficoltà riscontrata nel riconoscere ed allevare tali animali in laboratorio.

I composti farmaceutici (CF) sono ampiamente utilizzati in medicina e negli ultimi venti anni se ne rinvencono tracce in concentrazioni che vanno dai ng/L ai mg/L nelle matrici ambientali suolo e acqua, con sempre maggiore frequenza. I dati ecotossicologici riguardanti tali composti sono esigui. Essi riguardano per lo più crostacei di acqua dolce superficiale, come le specie di cladoceri (per lo più afferenti al genere *Daphnia*), mentre sono completamente mancanti in riferimento al biota di acqua sotterranea.

Durante i 21 giorni trascorsi presso l'IMDEA, la sottoscritta ed il team di ricerca di IMDEA AGUA hanno prima di tutto effettuato uno screening delle sostanze farmaceutiche che si rinvencono negli scarichi dell'Ospedale Alcoron di Madrid. La ricerca è stata effettuata allo scopo di individuare le sostanze a maggiore rischio di diffusione ambientale. Ai dati di concentrazione è stata associata la sensibilità di *D. magna*, stimata con il software ECOSAR (vs 1.1), che allo stato attuale risulta essere il target di riferimento. I risultati sono riportati nella Tabella 1.

NAME	H. Alcorcon (ng/L)	KINGDOM	Organism	Duration	Endpoint	Predicted mg/L
Atenolol	7028,95	Beta-blocker, antihypertensive	Daphnid	48h	LC50	17420,88
Propranolol	47,09	Nonselective beta-blocker	Daphnid	48h	LC50	37,16
Metoprolol	70,09	Adrenergic beta-antagonist	Daphnid	48h	LC50	228,14
Sotalol	238,44	Beta blocker	Daphnid	48h	LC50	3184,87
Caffeine	1450,79	Blocker of Adenosine A1-R Estimulant	Daphnid	48h	LC50	3458,16
Diltiazem	1740,79	Calcium-channel blocker	Daphnid	48h	LC50	40,591
Salbutamol	205,52	β 2-adrenoceptor agonist	Daphnid	48h	LC50	1651,309

Sede operativa:

Via Madonna del Piano, 10 50019 SESTO FIORENTINO (FI) Tel. +39 0555225983 Fax: +039 0555225920

Sede principale:

Largo Tonolli, 50 28922 VERBANIA PALLANZA (VB) Tel. +39 0323 518300 Fax: +39 0323 556513



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
Sede di Firenze



Tamsulosin	28,82	Alpha-adrenoceptor blocker	Daphnid	48h	LC50	75,71
Azithromycin	18602,81	Semisynthetic antibiotic	Daphnid	48h	LC50	0,70
Sulfamethoxazole	5971,07	Antibiotic	Daphnid	48h	LC50	2361,15
Cefalexin	nq	Semisynthetic antibiotic	Daphnid	48h	LC50	3788,54
Tetracycline	bld	Antibiotic (polyketide)	Daphnid	48h	LC50	1,49E+05
Lincomicina	1587,79	Antibiotic	Daphnid	48h	LC50	5577,73
Metronidazol	14930,55	Antibiotic	Daphnid	48h	LC50	4174,43
Ciprofloxacin	46903,23	Antibiotic	Daphnid	48h	LC50	8049,57
Metronidazole OH	6495,71	Antibiotic	Daphnid	48h	LC50	36941,45
Trimethoprim	3655,11	antibiotic	Daphnid	48h	LC50	1668,350
Ranitidine	4127,47	Histamine H2 antagonists	Daphnid	48h	LC50	4267,85
Cimetidine	nd	Histamine H2-receptor antagonis	Daphnid	48h	LC50	1969,21
Famotidine	112,49	Histamine H2 antagonists	Daphnid	48h	LC50	40,23
Venlafaxine	3934,02	Antidepressant	Daphnid	48h	LC50	10,31
Codeine	3937,8	Analgesics, opioid	Daphnid	48h	LC50	583,03
Acetaminofen	5846,7	Antiinfectant, Analgesic	Daphnid	48h	LC50	2157,16
Oxycodone	149,44	Narcotic, Analgesic,	Daphnid	48h	LC50	2068,37
Phenazone	209,13	Analgesic and antipyretic	Daphnid	48h	LC50	1417,04
Levamisole	90,89	Anthelmintic	Daphnid	48h	LC52	17,19

Tabella 1. Composti farmaceutici rinvenuti nello scarico dell'Ospedale Alcoron di Madrid nell'Aprile del 2016. Sensibilità acuta (LC50) a tali sostanze delle specie afferenti al genere *Daphnia* stimate con il software ECOSAR (vs. 1.1).

In seguito a tale ricognizione, si è proceduto ad effettuare 24 test acuti con le seguenti sostanze: propranololo (betabloccante), caffeina (stimolante) e lincomicina (antibiotico). Le specie utilizzate sono state: *Diacyclops crassicaudis crassicaudis* (copepode ciclopoide) e *Daphnia magna* (cladocero). *D. magna* è una specie target, universalmente usata nei test di ecotossicologia. Si tratta di un taxon che vive in ambienti dulciacquicoli di superficie, nella zona epibentonica. *D. crassicaudis crassicaudis* è una specie di crostacei copepodi ad ecologia intermedia tra organismi francamente epigei (come *Daphnia*) e quelli francamente

Sede operativa:

Via Madonna del Piano, 10 50019 SESTO FIORENTINO (FI) Tel. +39 0555225983 Fax: +039 0555225920

Sede principale:

Largo Tonolli, 50 28922 VERBANIA PALLANZA (VB) Tel. +39 0323 518300 Fax: +39 0323 556513

Sito web www.ise.cnr.it Codice Fiscale 80054330586 Partita IVA 02118311006



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
Sede di Firenze



sotterranei. Si tratta di un intermedio evolutivo (denominato "stigofilo") che presenta caratteristiche incipienti di stigobitizzazione (lunghi tempi di sviluppo, bassa fertilità), ma che è ancora in grado di sopravvivere negli ambienti superficiali. A differenza di *Daphnia*, *D. crassicaudis crassicaudis* si rinviene frequentemente e stabilmente nei corpi idrici sotterranei (acquiferi) e negli ecosistemi dipendenti dalle acque sotterranee (sorgenti e zone iporreiche). Per tale motivo, *D. crassicaudis crassicaudis* è da considerarsi una specie rappresentativa di tali ambienti e, come tale, in grado di rappresentare la tossicità dei CF negli stessi meglio di quanto non possa fare *D. magna*.

Per entrambe le specie, la lincomicina è risultata la sostanza meno tossica a livello acuto per entrambe le specie (*D. magna*: LC50: 67,27 mg/L a 48 h; *D. crassicaudis crassicaudis*: LC50 > 80 mg/L a 96 h). La caffeina è risultata fortemente tossica per *D. magna* (LC50: 3.85 mg/L a 48 h) e praticamente non tossica per *D. crassicaudis crassicaudis* (LC50 > 100 mg/L a 96 h). Il propanolo è risultata tossica per entrambe le specie: *D. crassicaudis crassicaudis* (LC50 = 35,23 mg/L a 96 h), *D. magna* (LC50 < 7.35 mg/L a 48 h).

Considerazioni finali

Rispetto alle stime di sensibilità effettuate con il software ECOSAR, *D. magna* è risultata molto più sensibile di quanto atteso a tutte e tre le sostanze. Questo risultato mette in evidenza la necessità di effettuare test ecotossicologici con le sostanze farmaceutiche al fine di caratterizzare in maniera ottimale il rischio ambientale che esse inducono negli ecosistemi acquatici.

I nostri risultati preliminari hanno indicato, inoltre, che *D. magna* è più sensibile di *D. crassicaudis crassicaudis* a tutte e tre le sostanze testate. La più elevata resistenza della specie stigofila *D. crassicaudis crassicaudis* è probabilmente da ricollegarsi al basso metabolismo che caratterizza le specie che afferiscono a tale categoria ecologica e a quella degli organismi stigobionti (abitanti obbligati degli ambienti di acqua sotterranea). Il basso metabolismo di tale specie potrebbe aver ritardato il bioaccumulo delle sostanze, rispetto a quanto accade per *D. magna*, con conseguente riduzione della tossicità delle stesse.

La tossicità del propanolo, lincomicina e caffeina è risultata effettiva solo a concentrazioni significativamente più elevate di quelle riscontrate negli scarichi dell'Ospedale Alcoron di Madrid, ovvero delle concentrazioni effettivamente attese a livello ambientale. Alla luce di tale risultato, si potrebbe concludere che le sostanze non rappresentano un rischio ambientale significativo. Tale conclusione, tuttavia, sarebbe prematura allo stato attuale. E' necessario procedere con test in cronico, ovvero esporre gli organismi a concentrazioni più basse di quelle testate in acuto, e quindi più vicine alle concentrazioni ambientali solitamente rinvenute, ma per l'intero ciclo vitale delle specie. Gli ultimi giorni di permanenza della sottoscritta presso i laboratori dell'IMDEA sono serviti appunto a pianificare i protocolli per gli esperimenti in cronico con *D. crassicaudis crassicaudis*, che è stata ritenuta la specie più idonea. I bassi livelli di metabolismo di tale specie, infatti, la espongono in natura a concentrazioni ambientali sub-letali per periodi più lunghi rispetto a *D. magna*. Inoltre, quest'ultima è una specie partenogenetica, non idonea quindi ad investigare gli effetti di concentrazioni sub-letali di CF sulla fertilità di questi organismi.

Sede operativa:

Via Madonna del Piano, 10 50019 SESTO FIORENTINO (FI) Tel. +39 0555225983 Fax: +039 0555225920

Sede principale:

Largo Tonolli, 50 28922 VERBANIA PALLANZA (VB) Tel. +39 0323 518300 Fax: +39 0323 556513



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
Sede di Firenze



E' stato convenuto di presentare i risultati preliminari ottenuti al workshop intitolato "*Leading edge technologies for the removal of emerging pollutants*", presso l'Universidad Rey Juan Carlos, Campus Móstoles, Móstoles (Madrid), il prossimo 24 Novembre 2016, con un poster.

Firenze, 21 Novembre 2016

Il fruitore del programma

TIZIANA DI LORENZO

Sede operativa:

Via Madonna del Piano, 10 50019 SESTO FIORENTINO (FI) Tel. +39 0555225983 Fax: +039 0555225920

Sede principale:

Largo Tonolli, 50 28922 VERBANIA PALLANZA (VB) Tel. +39 0323 518300 Fax: +39 0323 556513

Sito web www.ise.cnr.it Codice Fiscale 80054330586 Partita IVA 02118311006