



MINISTERO DELL'AMBIENTE
E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE

Realizzazione di uno studio di valutazione del Rischio Ambientale e Sanitario associato alla contaminazione da sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) nel Bacino del Po e nei principali bacini fluviali italiani

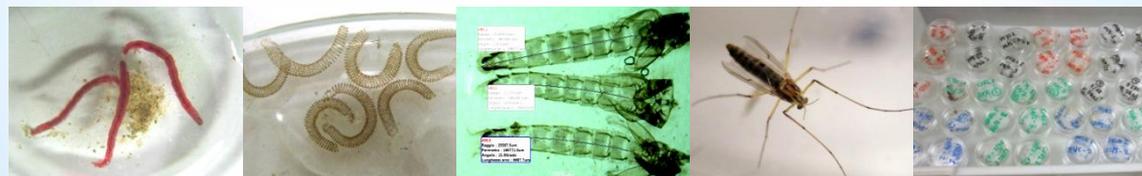


Il rischio ecologico dei PFAS. Esperienze in laboratorio mediante test multigenerazionali

Laura Marziali, Fabrizio Stefani

CNR-IRSA Istituto di Ricerca Sulle Acque, Via del Mulino 19, 20861 Brugherio (MB)

E-mail: marziali@irsa.cnr.it



Perfluorurati:



- * Elevata persistenza
- * Ampia diffusione
- * Tendenza al bioaccumulo
- * Potenzialmente tossici



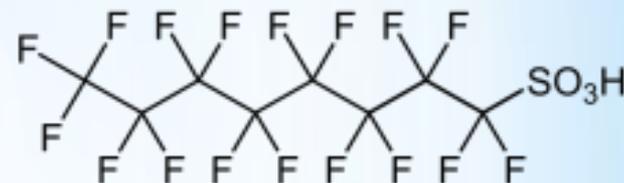
Effetti tossici su popolazioni acquatiche naturali esposte cronicamente alla contaminazione?



Ricerca bibliografica di dati ecotossicologici pubblicati in letteratura

■ Acido perfluorottansolfonico (PFOS):

- Elevata tendenza al bioaccumulo
- *Daphnia magna*, 48 h → EC_{50} = 130 mg/l
- *Daphnia magna*, 21 giorni → NOEC = 12 mg/l
- *Pseudokirchneriella subcapitata*, 96 h → EC_{50} = 48,2 mg/l
- *Chironomus tentans*, 20 giorni → NOEC = 21,7 µg/l



■ Acido perfluorottanoico (PFOA):



- Basso potenziale di bioaccumulo
- *Daphnia magna*, 48 h → EC_{50} = 480 mg/l
- *Daphnia magna*, 21 giorni → NOEC = 20 mg/l
- *Pseudokirchneriella subcapitata*, 96 h → NOEC = 12,5 mg/l

■ Acido perfluorobutansolfonico (PFBS):

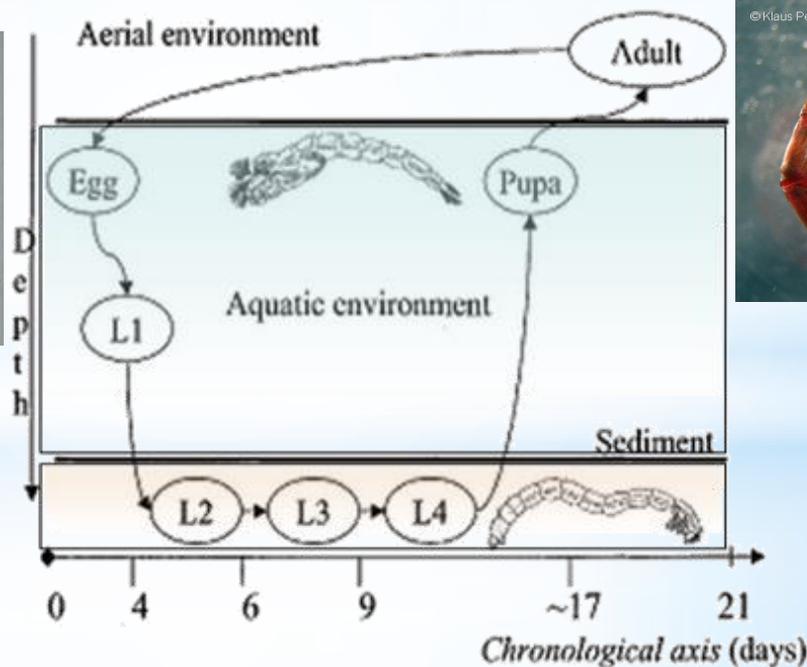
- Bassa capacità di bioaccumulo
- Pochi dati sulla tossicità



Pochi dati su effetti a lungo termine

Chironomus riparius (Insetti, Ditteri, Chironomidi)

- *Chironomus* 3 ordini di grandezza più sensibile rispetto ad altri invertebrati alla presenza di PFOS: possibile interazione con l'emoglobina (MacDonald et al., 2004)
- Insetti olometaboli
- Ampia distribuzione
- Vivono a contatto con il sedimento
- Ciclo vitale breve: 28 giorni a 20 °C
- Facilmente allevabili in laboratorio



- Utilizzati nei test di tossicità OECD 218, 219 e 233

- * Test ecotossicologico multi-generazionale* basato sul ciclo vitale di *Chironomus riparius* per la valutazione degli effetti a lungo termine indotti dalla presenza di microinquinanti nell'acqua e/o nel sedimento
- * Estensione dei protocolli OECD 218, 219 e 233 per *Chironomus riparius*: vengono replicati fino a 9-12 generazioni
- * Ipotesi: l'esposizione a lungo termine a basse concentrazioni può determinare una riduzione della fitness della popolazione
- * Permette di analizzare gli effetti utilizzando due approcci:
 1. *life-traits*: parametri di *life-history* quali sopravvivenza, sviluppo e riproduzione, indicatori di stress
 2. variabilità genetica: potenziale evolutivo e adattativo della popolazione, rischio di estinzione a lungo termine

*Approccio multigenerazionale:

Postma J.A., Davids C., 1995. Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30: 195-202.

Vogt C., Nowak C., Barateiro Diogo J., Oetken M., Schwenk K., Oehlmann J., 2007. Multi-generation studies with *Chironomus riparius*. Effects of low tributyltin concentrations on life history parameters and genetic diversity. *Chemosphere* 67: 2192-2200.

Concentrazione nominale di 10 $\mu\text{g/L}$ di PFOS, PFOA e PFBS, paragonabile ai livelli massimi ambientali riscontrati nei corsi d'acqua italiani



effetti a lungo termine sulla popolazione di *C. riparius* esposta per 10 generazioni ??

ORGANISMO TEST: *C. riparius*

- * Popolazione di partenza di *C. riparius* raccolta nel fiume Lambro
- * Allevamento in camera termostatica a 20 ± 1 °C, fotoperiodo di 16:8, intensità 500-1000 lux





Per il controllo e per ogni contaminante vengono predisposti 10 recipienti in vetro (19 x 19 x 8 cm), contenenti:

- * sedimento minerale: granulometria 300-63 μm
- * acqua standard (formula US EPA, 2000)
- * 60 larve di *C. riparius* (stadio II): 600 larve per ogni trattamento

Per ogni contaminante e per il controllo sono predisposte 2 gabbie, ognuna delle quali contiene 5 recipienti

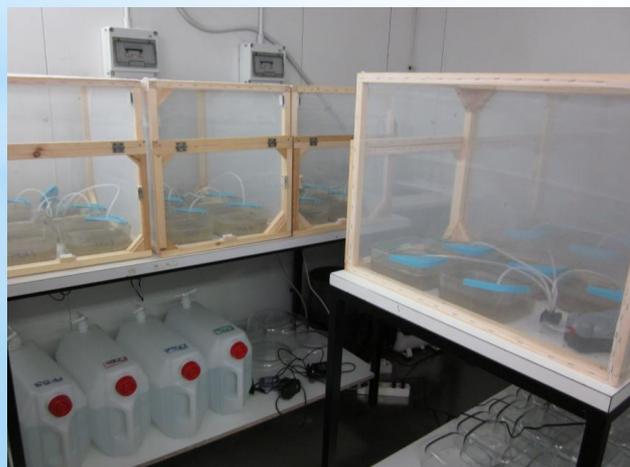


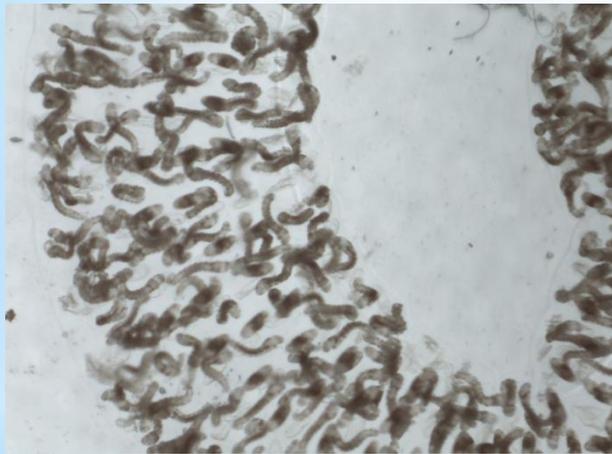
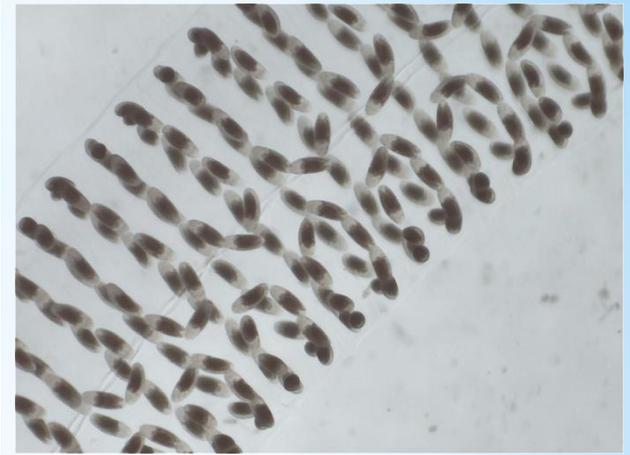
Larve nutrite con Tetra-Min 3 volte a settimana e controllate quotidianamente

Controllati 3 volte a settimana temperatura dell'acqua, ossigeno disciolto, conducibilità elettrica, pH

Monitorata settimanalmente la concentrazione di ammoniaca e di contaminanti (cromatografia liquida-spettrometria di massa)

L'acqua evaporata viene rabboccata con acqua deionizzata





- * I cordoni di uova prodotti in ogni gabbia vengono di volta in volta rimossi e allevati in altri recipienti, nella stessa acqua in cui sono stati deposti
- * Le uova deposte nei 2-3 giorni di massima produzione, dopo 7 giorni dalla schiusa (larve II stadio), vengono utilizzate per condurre il test della generazione successiva
- * Il protocollo è stato replicato per 10 generazioni (durata del test: 1 anno)

Parametri di sopravvivenza-sviluppo

- * **Emergence ratio:** numero totale di individui sfarfallati in ogni recipiente
- * **Development rate:** tempo medio di sviluppo
- * **EmT₅₀ (mean emergence time):** tempo medio di sfarfallamento

Parametri di crescita

- * **peso degli adulti (maschi e femmine):** essiccati per 24 ore a 60°C e pesati singolarmente (peso secco)
- * **peso delle larve:** 9 larve per ogni recipiente pesate prima dell'impupamento (peso fresco)
- * **lunghezza delle pupe:** lunghezza delle esuvie pupali (maschi e femmine)



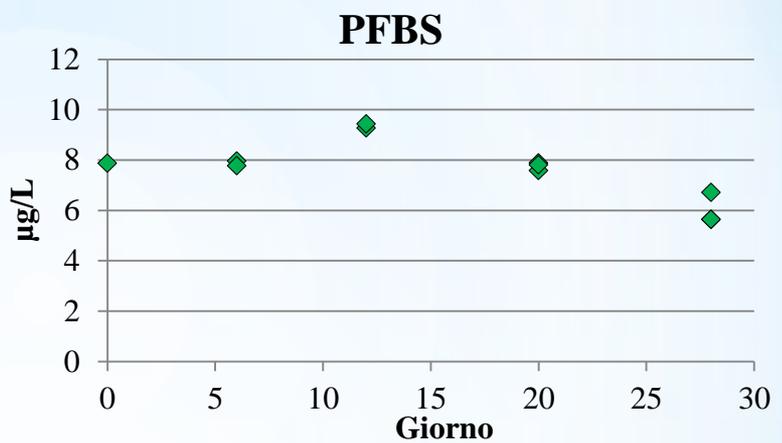
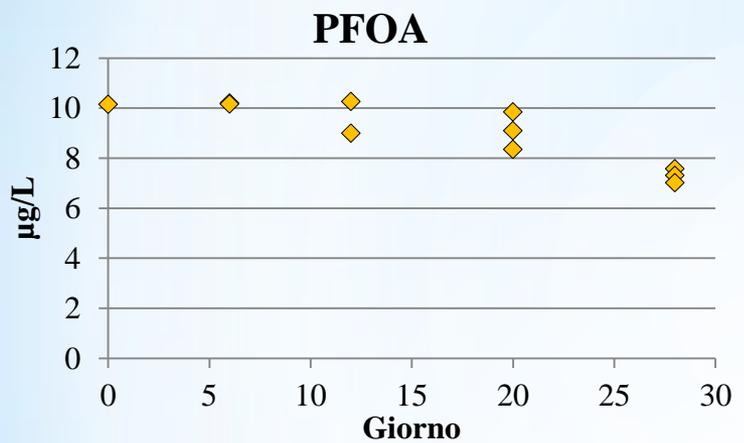
Parametri di riproduzione

- * **numero di cordoni di uova per femmina:** registrato giornalmente per ogni gabbia
- * **numero di uova per cordone:** numero medio di uova per cordone
- * **numero di uova schiuse:** rapporto fra uova schiuse e non schiuse in ogni cordone dopo 5 giorni dalla deposizione
- * **Sex ratio:** rapporto tra esuvie maschio e femmina per ogni recipiente

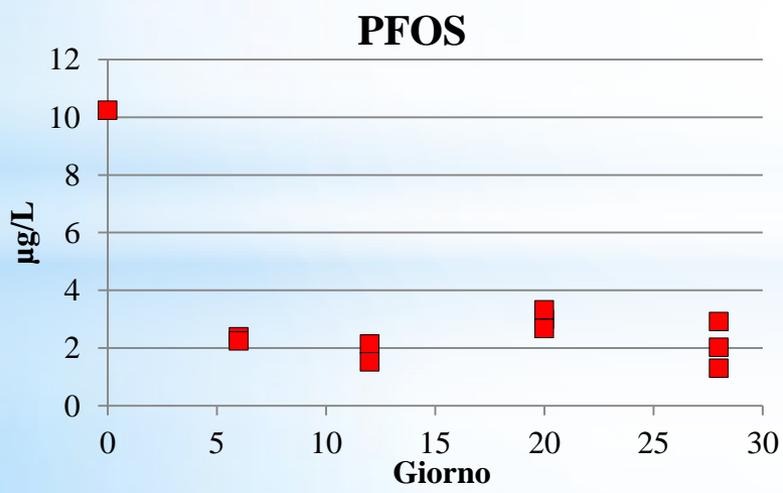
Concentrazioni misurate dei PFAS



Sono state misurate le concentrazioni di PFOS, PFOA e PFBS durante il test:



PFOA e PFBS relativamente costanti: calo della concentrazione di circa 2 µg/l



PFOS: crollo della concentrazione a 2-3 µg/l per evaporazione

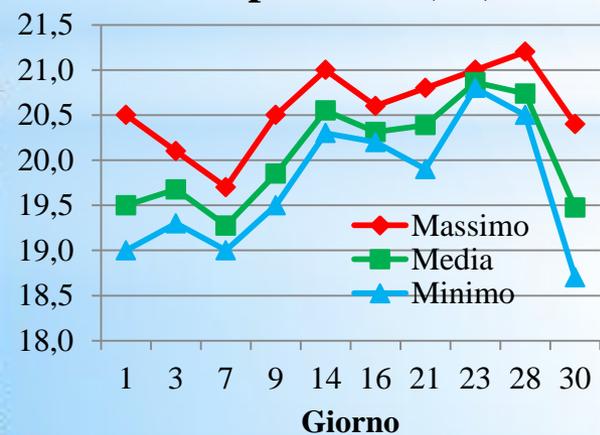
Sono stati considerati validi i test che soddisfano i criteri OECD (218, 219 e 233):

- * temperatura = $20 \pm 1^\circ\text{C}$
- * ossigeno disciolto $\geq 60\%$
- * pH = 6-9

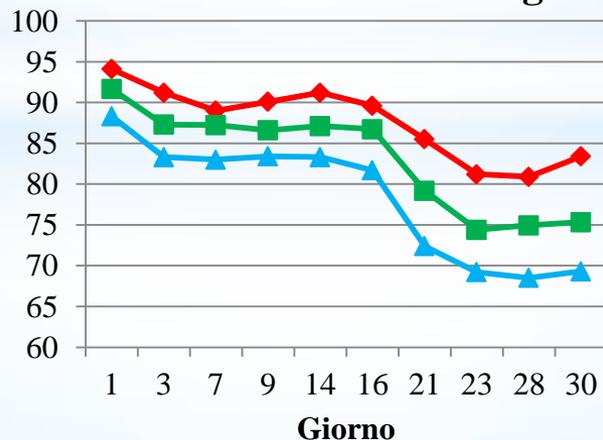
- * sfarfallamento di $\geq 70\%$ degli individui del controllo
 - 1° generazione: sfarfallamento sempre $\geq 70\%$
 - 2° - 10° generazione: considerate valide solo le repliche (controllo e trattati) con sfarfallamento $\geq 70\%$

➔ Possibili effetti sub-letali

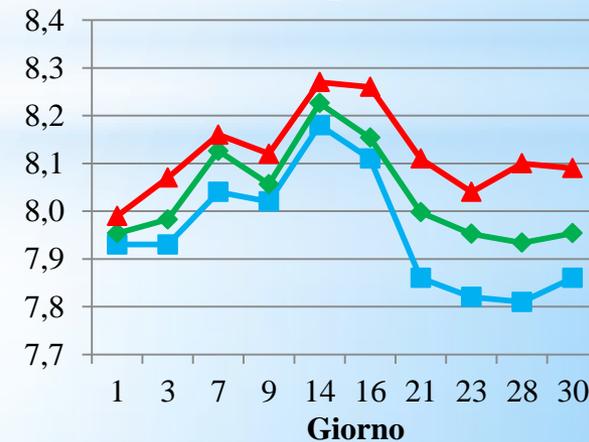
Temperatura ($^\circ\text{C}$)

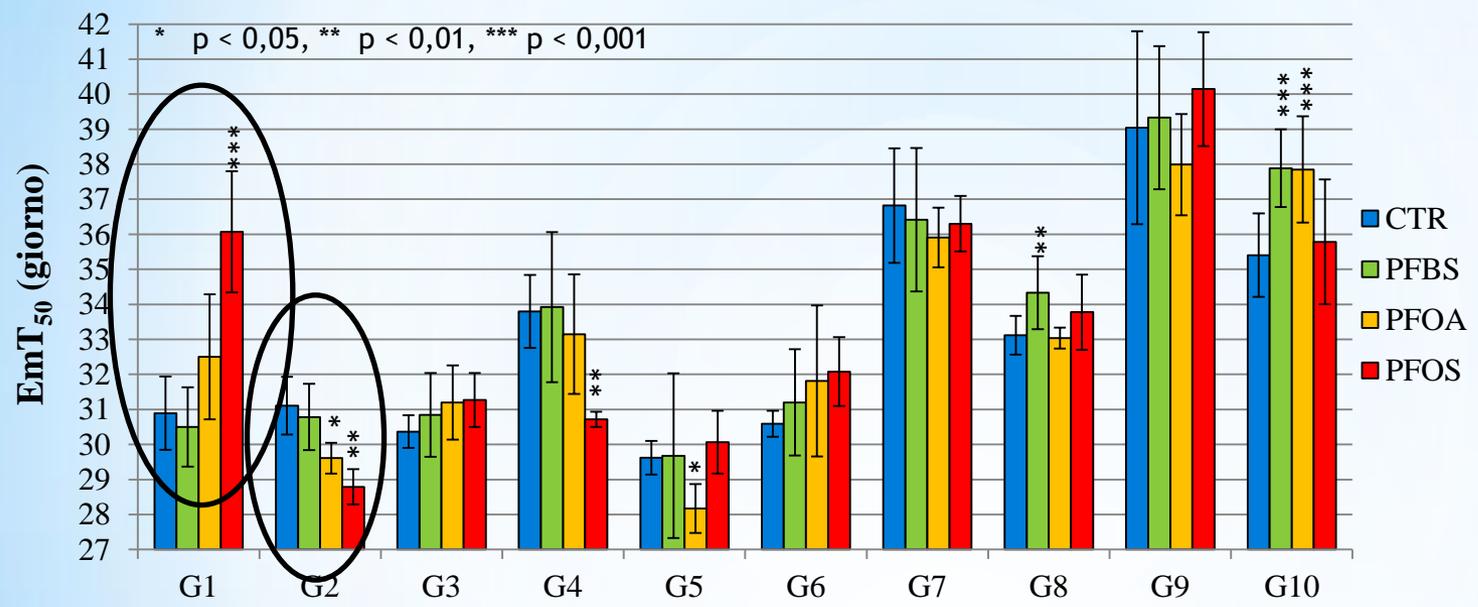


% di saturazione di ossigeno

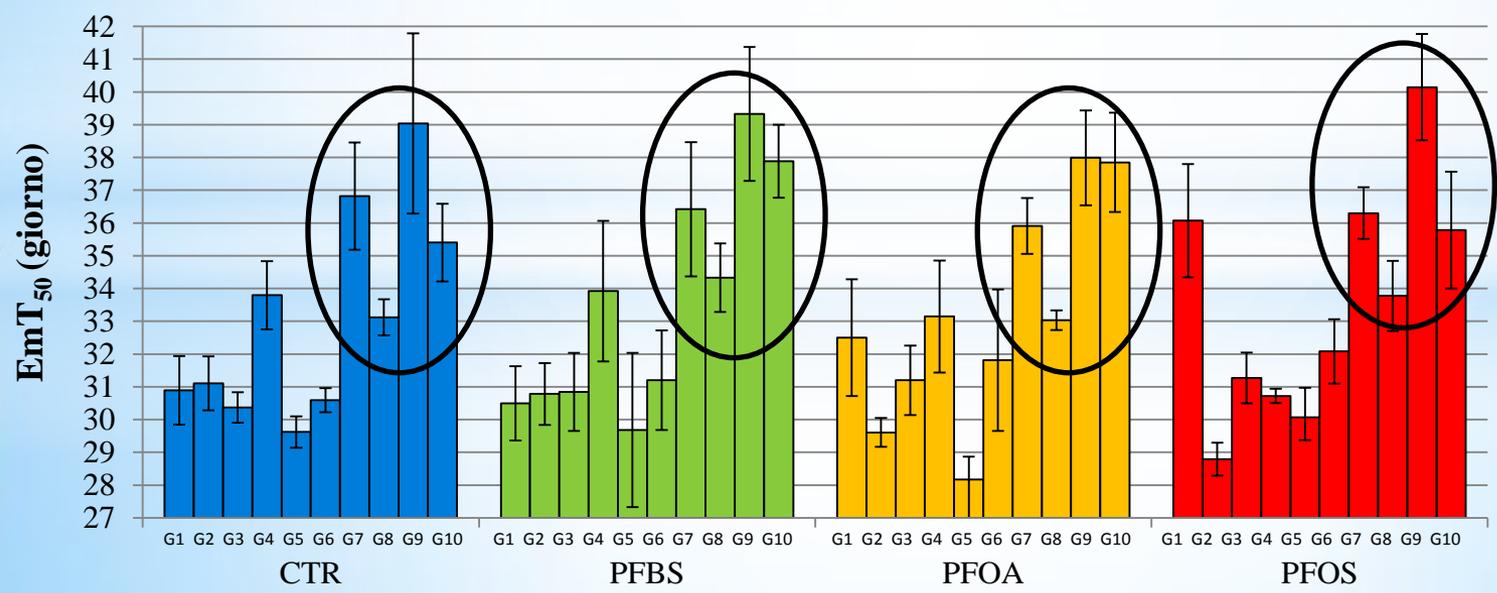


pH





PFOA e PFOS sono in grado di alterare il normale ciclo vitale di *C. riparius*, anticipando o ritardando l'emergenza degli adulti

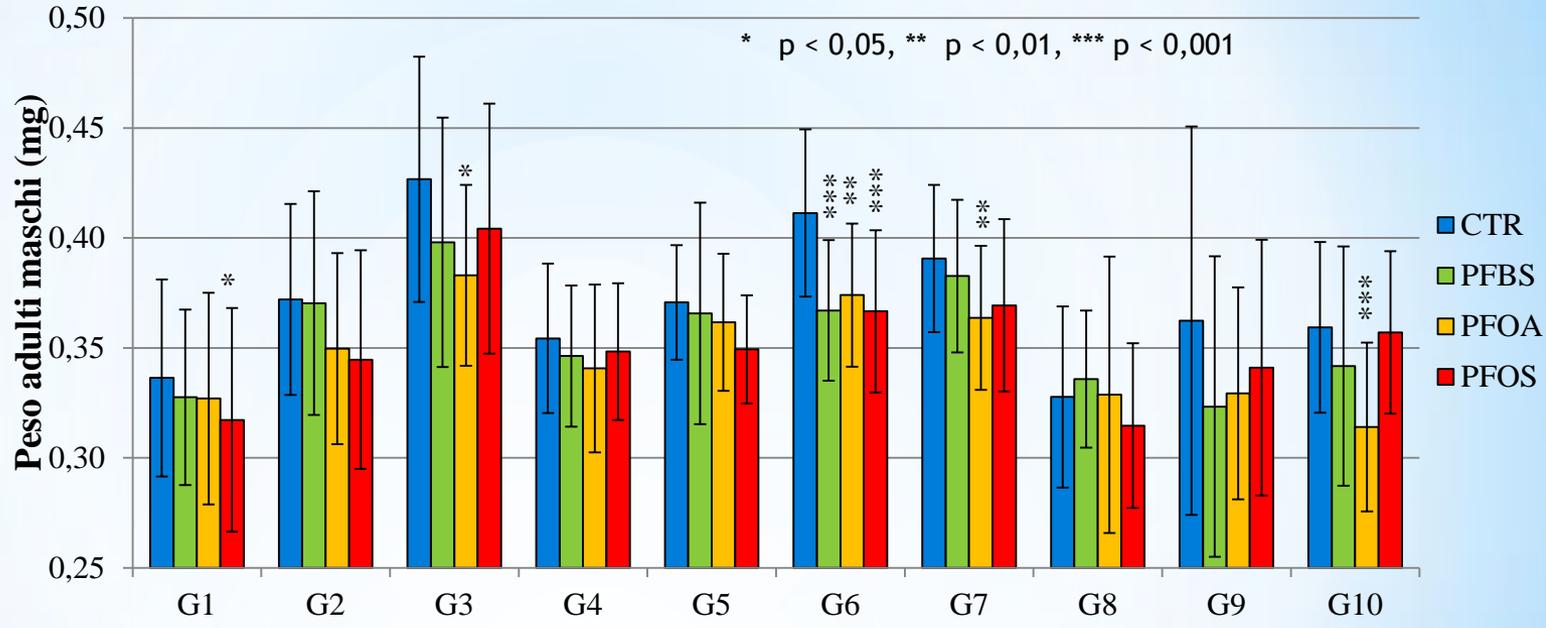


Lo stress di allevamento induce una condizione di sofferenza generale in tutte le popolazioni dopo la G6

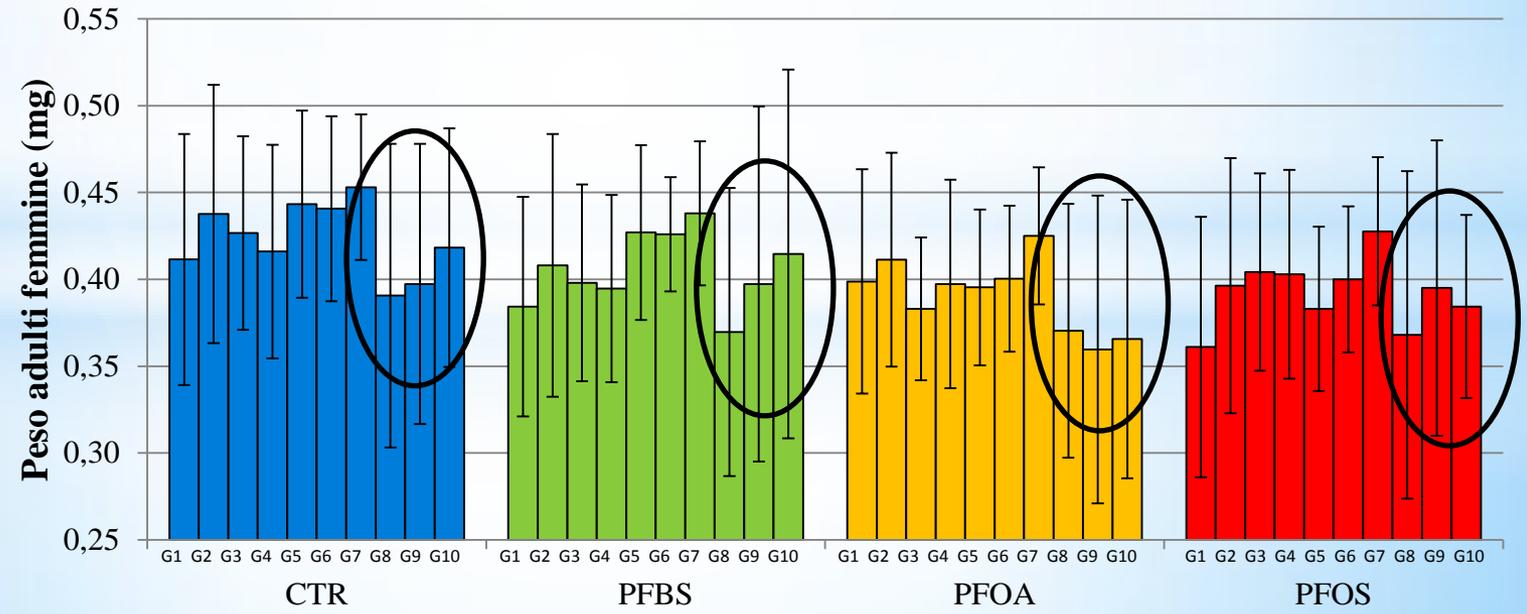
Parametri di crescita: peso degli adulti

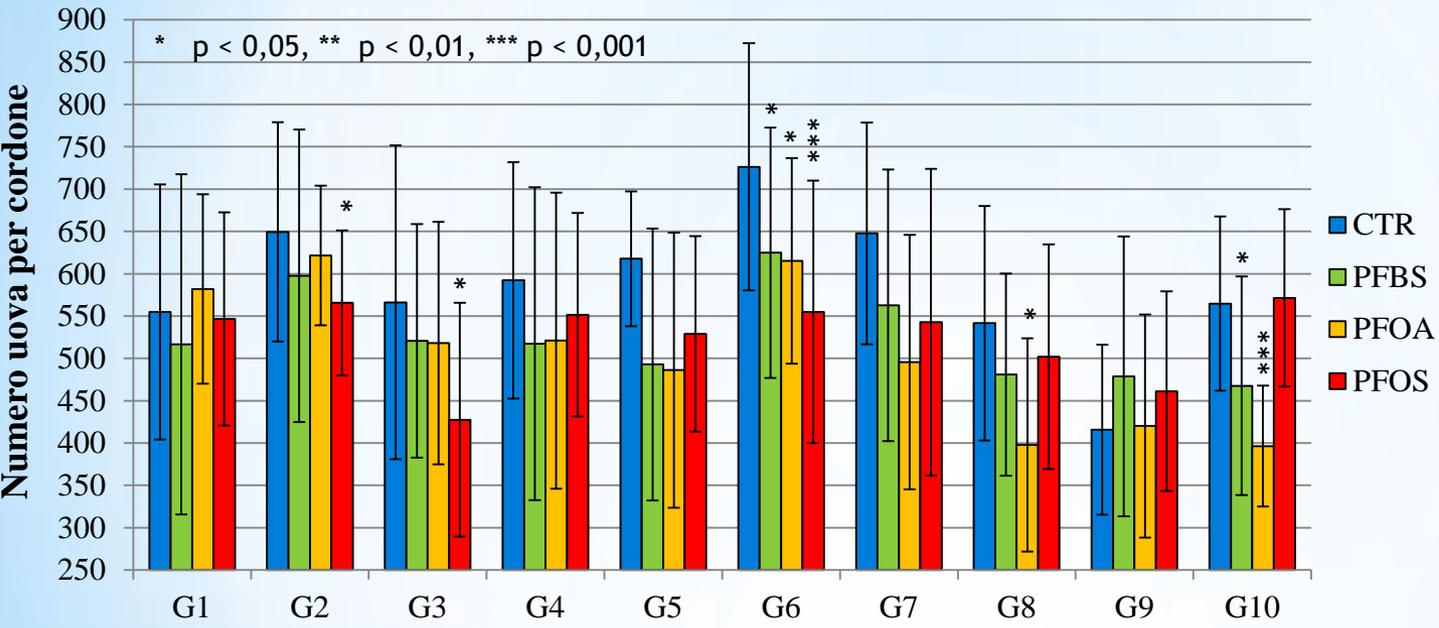


I PFAS determinano una riduzione della crescita:
 - peso degli adulti
 - peso delle larve
 - lunghezza delle exuvie pupali



Nelle ultime generazioni si verifica un calo progressivo del peso in tutte le popolazioni: sofferenza





In generale il numero medio di uova per cordone è risultato inferiore per i trattati

Altri parametri di riproduzione:

- Numero totale di cordoni di uova fertili per gabbia
- Numero di cordoni per femmina
- Numero di uova schiuse a 5 giorni dalla deposizione
- Sex ratio



Differenze non significative

Confronto trattati-controllo per ogni generazione

	Life-traits	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
Sviluppo	<i>Emergence Ratio</i>										
	<i>Development Rate</i>	PFOS	PFOS		PFOS						
	EmT ₅₀	PFOS	PFOS		PFOS						
Crescita	Peso delle larve	PFOS				PFOS			PFOS		
	Lunghezza esuvie: maschi	PFOS	PFOS	-		-	PFOS	-		-	
	Lunghezza esuvie: femmine	PFOS		-		-	PFOS	-		-	
	Peso adulti: maschi	PFOS				PFOS	PFOS				
	Peso adulti: femmine	PFOS				PFOS	PFOS				
	<i>Sex ratio</i>										
	Numero uova per cordone		PFOS	PFOS			PFOS				
Riproduzione	Uova non schiuse										
	Numero cordoni per femmina										

L'effetto del PFOS tende ad attenuarsi dopo la G6

adattamento?

Confronto trattati-controllo per ogni generazione



	Life-traits	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	
Sviluppo	<i>Emergence Ratio</i>											
	<i>Development Rate</i>	PFOA	PFOA								PFOA	
	EmT ₅₀		PFOA			PFOA					PFOA	
Crescita	Peso delle larve											
	Lunghezza esuvie: maschi	PFOA	PFOA	-		-	PFOA	-		-	PFOA	
	Lunghezza esuvie: femmine	PFOA		-	PFOA	-	PFOA	-	PFOA	-	PFOA	
	Peso adulti: maschi			PFOA			PFOA	PFOA			PFOA	
	Peso adulti: femmine					PFOA	PFOA	PFOA			PFOA	
Riproduzione	<i>Sex ratio</i>					PFOA						
	Numero uova per cordone						PFOA		PFOA		PFOA	
	Uova non schiuse	L'effetto del PFOA si mantiene in tutte le generazioni										
	Numero cordoni per femmina	L'effetto del PFOA si mantiene in tutte le generazioni										



risposta fisiologica?

Confronto trattati-controllo per ogni generazione



	Life-traits	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	
Sviluppo	<i>Emergence Ratio</i>											
	<i>Development Rate</i>								PFBS		PFBS	
	EmT ₅₀								PFBS		PFBS	
Crescita	Peso delle larve											
	Lunghezza esuvie: maschi	PFBS		-		-	PFBS	-		-	PFBS	
	Lunghezza esuvie: femmine	PFBS		-		-		-		-		
	Peso adulti: maschi						PFBS					
	Peso adulti: femmine											
	<i>Sex ratio</i>											
Riproduzione	Numero uova per cordone						PFBS				PFBS	
	Uova non schiuse	L'effetto del PFBS tende a manifestarsi a partire dalla G6										
	Numero cordoni per femmina											

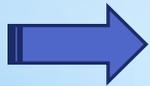


effetti su popolazioni già stressate o isolate?

- * I contaminanti non hanno indotto mortalità alla concentrazione nominale indagata
- * PFOS e PFOA alterano lo sviluppo e la crescita, mentre non hanno effetti significativi sulla riproduzione
- * PFOS potrebbe indurre adattamento: in corso test sulla resistenza acquisita a PFOS e PFOA
- * PFOA sembra innescare una risposta fisiologica (MacDonald et al., 2004)
- * PFBS ha indotto effetti minori, evidenti solo su popolazioni già stressate o isolate
- * Quale ruolo hanno i PFAS nel determinare una riduzione di fitness nella popolazione?
Approccio genetico



Fabrizio Stefani: Effetti dei perfluorurati sulla variabilità genetica di *C. riparius*



Marianna Rusconi: Studi in campo: il caso studio del fiume Bormida

Grazie per l'attenzione



Grazie a Federica Rosignoli, Alessio Fumagalli, Marianna Rusconi, Simone Bardine,
Emiliano Veronesi per il prezioso aiuto in laboratorio e in campo