



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

**Saggi biologici sui sedimenti
marino costieri della Toscana al
fine di identificare la matrice sulla
quale effettuare la valutazione
della classe di qualità ambientale:
anno 2013**





ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

Saggi biologici sui sedimenti marino costieri della Toscana al fine di identificare la matrice sulla quale effettuare la valutazione della classe di qualità ambientale: anno 2013



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

Saggi biologici sui sedimenti marino costieri della Toscana al fine di identificare la matrice sulla quale effettuare la valutazione della classe di qualità ambientale: anno 2013

A cura di:

Gioia Benedettini

Francesco Vigna Guidi

ARPAT – Area Vasta Costa- Settore Laboratorio - UO Biologia

Marcello Ceccanti

Daniela Verniani

ARPAT – Area Vasta Costa - Settore Mare

Autori:

Gioia Benedettini

Francesco Vigna Guidi

ARPAT – Area Vasta - Settore Laboratorio - UO Biologia

Daniela Verniani

ARPAT – Area Vasta Costa - Settore Mare

Campionamenti eseguiti da personale del Settore Mare con M/N Poseidon

© ARPAT 2014



INDICE

1	INTRODUZIONE	5
1.1	<i>Finalità e obiettivi</i>	5
1.2	<i>Classe di tossicità in funzione della specie utilizzata nel saggio ecotossicologico</i>	5
2	MATERIALI E METODI	6
2.1	<i>Test di tossicità acuta con batteri bioluminescenti Vibrio fischeri</i>	6
2.2	<i>Test di tossicità acuta con il rotifero Brachionus plicatilis</i>	7
2.3	<i>Test di tossicità con l'alga marina Phaeodactylum tricorutum</i>	7
2.4	<i>Determinazione della tossicità letale a 14 giorni con Artemia franciscana</i>	7
3	RISULTATI	9
4	CONCLUSIONI	11

Parole chiave:

Sedimenti

Ecotossicologia

1 INTRODUZIONE

1.1 Finalità e obiettivi

Gli esiti del monitoraggio sulle acque marino costiere effettuati negli anni 2010 2012 hanno evidenziato che alcune sostanze superano i limiti fissati dalla tabella 2/A dell'allegato 1 alla parte III del Dgls 152/2006 e smi (in particolare DM 260/10) sia nei sedimenti che nella colonna d'acqua. Al fine del controllo delle alterazioni riscontrate, secondo quanto previsto dall'allegato 1, lettera A.2.6.1 del Decreto 8 novembre 2006, n. 260, il monitoraggio annuale dei sedimenti è stato pianificato includendo anche test di tossicità finalizzati ad evidenziare eventuali effetti eco-tossicologici a breve e lungo termine. Tale monitoraggio, così come previsto dalla norma, effettuato per la prima volta nel 2012 e poi successivamente è stato ripetuto per l'anno 2013.

1.2 Classe di tossicità in funzione della specie utilizzata nel saggio ecotossicologico

Per la definizione della classe di tossicità è stata utilizzata la **Tabella 1.1** tratta dal documento APAT ICRAM (2007) – “Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini”.

Il criterio di classificazione ecotossicologica si basa sul risultato peggiore riscontrato sul singolo campione.

Tabella 1.1: estratto della tabella inserita nel documento APAT-ICRAM “Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini (2007) modificata.

Specie test	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità media	Tossicità alta	Tossicità molto alta
<i>Pheodactylum tricorutum</i>	$EC_{20} \geq 90\%$	$EC_{20} < 90\%$ e $EC_{50} > 100\%$	$40\% \leq EC_{50} < 100\%$	$EC_{50} < 40\%$
<i>Brachionus plicatilis</i>	$EC_{20} \geq 90\%$	$EC_{20} < 90\%$ e $EC_{50} > 100\%$	$40 \leq EC_{50} < 100\%$	$EC_{50} < 40\%$
<i>Vibrio fischeri</i>	$EC_{20} \geq 90\%$	$EC_{20} < 90\%$ e $EC_{50} \geq 90\%$	$20\% \leq EC_{50} < 90\%$	$EC_{50} < 20\%$

2 MATERIALI E METODI

Gli organismi scelti appartengono a tre livelli trofici differenti: saprofiti (*Vibrio fischeri*), produttori primari (*Phaeodactylum tricornutum*) e filtratori (*Brachinus plicatilis*), come richiesto dalla normativa. I saggi di tossicità acuta sono stati eseguiti su 14 stazioni rappresentative dei 14 corpi idrici. Su quattro di queste è stato, inoltre, eseguito il test cronico con *Artemia franciscana*.

Le analisi eco-tossicologiche sono state effettuate sull'elutriato al fine di valutare la presenza di tossici idrosolubili.

2.1 Test di tossicità acuta con batteri bioluminescenti *Vibrio fischeri*

Il metodo (Metodo: APAT IRSA CNR 8030 Manuale 29/03: 2003) consente di valutare la tossicità acuta di campioni utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri* dopo un tempo di contatto di 30 minuti con il campione in esame. Valori di pH inferiori a 6 o superiori a 8,5, così come valori di salinità inferiori a 20‰ o superiori a 50‰ possono influire sulla sopravvivenza dei batteri, inibendone la naturale luminosità. Al fine di eliminare queste fonti di interferenza è possibile procedere alla correzione di questi valori riportandoli nei limiti.

Il risultato può essere espresso come: valore peggiore di EC₅₀¹ nei tre tempi di esposizione oppure come valore peggiore di EC₂₀ nei tre tempi di esposizione, oppure come % di inibizione, oppure come presenza/assenza di tossicità, a seconda di quanto richiesto dalla normativa vigente o dal cliente.

Generalmente, a meno che non venga chiesto altrimenti, i risultati sono espressi seguendo le sotto elencate regole:

- Il risultato si esprime come EC₅₀
- Nel caso in cui la EC₅₀ di un campione sia superiore al 100%, il risultato viene espresso anche come EC₂₀, se calcolabile.
- Quando la percentuale di inibizione è superiore o uguale al 20% ma non è calcolabile l'EC₂₀, il risultato si esprime come % di inibizione e viene inserita la seguente nota: "*Per il parametro "tossicità acuta con batteri bioluminescenti (*Vibrio fischeri*)" l'effetto tossico è rilevato solo alle concentrazioni più elevate quindi non è possibile eseguire elaborazioni statistiche.*" Deve inoltre essere inserito il numero di repliche con cui è stato eseguito il test.
- Se la percentuale di effetto è inferiore al 20%, il risultato si esprime come assenza di tossicità.

¹ EC₅₀: concentrazione efficace sul 50% degli organismi; EC₂₀: concentrazione efficace sul 20% degli organismi

2.2 Test di tossicità acuta con il rotifero *Brachionus plicatilis*

Il saggio si basa sulla valutazione della mortalità del rotifero *Brachionus plicatilis* (Halbach et al., 1983) in presenza di fonti di stress, rispetto ad un controllo. Il saggio è stato condotto secondo il protocollo sperimentale (Snell, Persoone, 1989) fornito da Microbiotests Inc. produttrice del Rotoxkit test (Metodo interno MI/B/05/004 secondo SOP del Rotoxkit M della ditta MicroBioTests Inc.).

Il risultato può essere espresso come: EC₅₀ o presenza /assenza di tossicità.

2.3 Test di tossicità con l'alga marina *Phaeodactylum tricornutum*

Le modalità di determinazione della inibizione della crescita dell'alga unicellulare marina *Phaeodactylum tricornutum* sono descritte nel Metodo: ISO 10253: 2006

La densità algale deve essere misurata ogni 24h ± 2h. Per la misura della densità algale è stato usato un conta particelle elettronico.

I risultati possono essere espressi come EC₅₀, EC₂₀ o EC₁₀. Nel caso in cui non siano calcolabili, il risultato viene espresso come "assenza di tossicità".

2.4 Determinazione della tossicità letale a 14 giorni con *Artemia franciscana*

La determinazione della tossicità letale a lungo termine nei confronti del crostaceo marino *Artemia franciscana* (Crustacea: Anostraca) viene eseguito secondo Metodo MI/B/05/010; questo metodo prevede la determinazione della concentrazione o diluizione che, in 14 giorni, nelle condizioni definite dal metodo stesso, causa la morte del 50% degli organismi esposti.

Questa concentrazione, nota come concentrazione letale, è definita come EC₅₀ a 14 d.

Se necessario e possibile, può anche essere determinata la concentrazione che causa la morte del 20% degli organismi esposti. Questa concentrazione è indicata come EC₂₀ a 14 d.

L'esposizione degli organismi deve avvenire alla luce, in presenza di fotoperiodo. Il saggio, della durata di 14 giorni, è semistatico, con rinnovo delle soluzioni di prova ed alimentazione degli organismi effettuata ad intervalli definiti (48 h; 5, 7, 9, 12 giorni). Il saggio deve essere eseguito in un ambiente a temperatura controllata pari a (25 ± 2)°C, con illuminazione di (900 ± 100) lux e con fotoperiodo pari a 14 h di luce e 10 h di buio. L'atmosfera deve essere esente da vapori o polveri tossiche per gli organismi di prova.

Per l'alimentazione degli organismi devono essere utilizzate aliquote opportune di una sospensione della microalga *D. tertiolecta* addizionate al momento della preparazione delle soluzioni di prova in modo da ottenere una densità di 10⁵ cellule/ml.

Al termine della prova, 14 giorni, viene calcolata la percentuale di mortalità a ciascuna concentrazione, corretta con la formula di Abbott.

Se non sono calcolabili l'EC₅₀ e l'EC₂₀ il risultato è espresso come “assenza di tossicità”.

I risultati sono considerati validi se al termine della prova la media della mortalità del controllo è $\leq 15\%$.

Il risultato può essere espresso come: EC₅₀, EC₂₀ o presenza /assenza di tossicità.

3 RISULTATI

Sono stati eseguiti 14 campionamenti in stazioni rappresentativi di ciascun corpo idrico con particolare attenzione alle stazioni che avevano fatto registrare il maggior numero di superamenti di alcune sostanze della tabella 2/A dell'allegato 1 alla parte III del d.Lgs 152/2006 e smi (in particolare DM 260/10). Le stazioni in cui è stato eseguito il test cronico sono quelle che avevamo mostrato maggior criticità. Di seguito sono elencati in dettaglio i risultati dei test effettuati

Tabella 3.1: risultati dei test di tossicità per ciascun organismo utilizzato: anno 2013

Codice	Punto di prelievo	Test di tossicità acuta			Test di tossicità cronica
		<i>Vibrio. fischeri</i>	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Artemia. franciscana</i>
SEM_MC30	Marina di Carrara	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	
SEM_NT30	Nettuno	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	EC ₁₀ = 98,8% EC ₂₀ ≥ 90% EC ₅₀ = 111,9%	
SEM_FM30	Fiume Morto	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	
SEM_LV37	Livorno	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità
SEM_RL20	Rosignano	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità
SEM_SL60	Salivoli	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	
SEM_CR75	Carbonifera	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	
SEM_FB30	Foce Bruna	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	EC ₁₀ = 99,3% EC ₂₀ ≥ 90% EC ₅₀ = 112,6%	
SEM_FO30	Foce Ombrone	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	EC ₁₀ = 97,4% EC ₂₀ ≥ 90% EC ₅₀ = 110,5%	
SEM_CF30	Cala di Forno	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	EC ₁₀ = 97,4% EC ₂₀ ≥ 90% EC ₅₀ = 110,4%	
SEM_AL30	Foce Albegna	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	
SEM_SS64	Porto S. Stefano	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità
SEM_AS50	Ansedonia	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	
SEM_ML05	Mola	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	EC ₁₀ = 97,9% EC ₂₀ ≥ 90% EC ₅₀ = 111%	Assenza di tossicità

La classificazione dei sedimenti è stata effettuata secondo i criteri stabiliti nel documento APAT ICRAM (2007) – “Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini” ai fini della classe di tossicità dei sedimenti marini in funzione della specie utilizzata nel saggio ecotossicologico e come riportato in **Tabella 1.1**. Nella **Tabella 3.2** la classificazione ottenuta seguendo questi criteri.

Tabella 3.2: *Tabella riassuntiva di tutti i campioni e relativa classificazione per l'anno 2013.*

Corpo idrico	Codice	Punto di prelievo	Data campionamento	Classificazione
Costa Versilia	SEM_MC30	Marina di Carrara	03/10/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Serchio	SEM_NT30	Nettuno	03/10/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa pisana	SEM_FM30	Fiume Morto	01/10/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa livornese	SEM_LV37	Livorno	01/10/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa del Cecina	SEM_RL20	Rosignano	25/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Piombino	SEM_SL60	Salivoli	25/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Follonica	SEM_CR75	Carbonifera	24/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Punt'Ala	SEM_FB30	Foce Bruna	24/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Ombrone	SEM_FO30	Foce Ombrone	24/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Uccellina	SEM_CF30	Cala di Forno	24/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Osta Albegna	SEM_AL30	Foce Albegna	23/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Argentario	SEM_SS64	Porto S. Stefano	23/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Costa Burano	SEM_AS50	Ansedonia	23/09/2013	Tossicità assente o trascurabile
Arcipelago toscano	SEM_ML05	Mola	09/12/2013	Tossicità assente o trascurabile

I test di tossicità condotti sulle 14 stazioni rappresentative dei corpi idrici toscani indicano che i sedimenti sono tutti classificabili con una **TOSSICITÀ ASSENTE O TRASCURABILE**

4 CONCLUSIONI

I saggi di tossicità acuta effettuati con *Vibrio fischeri* e con *Brachionus plicatilis* sono risultati negativi in tutti i campioni analizzati.

L'organismo più sensibile ovvero l'alga unicellulare *Phaeodactylum tricornutum*, che lo scorso anno aveva evidenziato una situazione di tossicità media nelle stazioni di Ansedonia (anche se con valori al limite tra la classe con tossicità media e quella con tossicità assente o trascurabile), Albegna e Mola, nel 2013 indica assenza di tossicità in tutte le stazioni monitorate

Il test di tossicità cronica con *Artemia franciscana* ha dato esito negativo in tutti i campioni analizzati. I dati ottenuti nel 2012 e nel 2013 sono riassunti nella **Tabella 4.1**

Tabella 4.1: classificazione dei sedimenti in base ai test di tossicità eseguiti nel 2012 e nel 2013.

Corpo idrico	Codice	Punto di prelievo	Classificazione 2012	Classificazione 2013
Costa Versilia	SEM_MC30	Marina di Carrara	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa Serchio	SEM_NT30	Nettuno	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa pisana	SEM_FM30	Fiume Morto	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa livornese	SEM_LV37	Livorno	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa del Cecina	SEM_RL20	Rosignano	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa Piombino	SEM_SL60	Salivoli	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa Follonica	SEM_CR75	Carbonifera	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa Punt'Ala	SEM_FB30	Foce Bruna	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa Ombrone	SEM_FO30	Foce Ombrone	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa Uccellina	SEM_CF30	Cala di Forno	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Osta Albegna	SEM_AL30	Foce Albegna	Tossicità media	Tossicità assente o trascurabile
Costa Argentario	SEM_SS64	Porto S. Stefano	Tossicità assente o trascurabile	Tossicità assente o trascurabile
Costa Burano	SEM_AS50	Ansedonia	Tossicità media	Tossicità assente o trascurabile
Arcipelago toscano	SEM_ML05	Mola	Tossicità media	Tossicità assente o trascurabile

Premesso quanto sopra, è opportuno ricordare, come risulta dalla relazione sul monitoraggio delle acque marino costiere relativa al triennio 2010-2012, che per tutti i 14 corpi idrici della Toscana la classificazione dello stato chimico risulta **NON BUONA** sia basandoci sulle acque sia sui sedimenti. Allo stesso tempo però i test biologici effettuati a tre livelli trofici diversi ci rassicurano per l'assenza di tossicità.

Al momento ARPAT sta conducendo, come indicato dall'allegato 1, lettera A.2.8 punto 6 del Decreto 260/06 e richiesto dalla Regione Toscana, uno **studio finalizzato a individuare i livelli di fondo naturali degli inquinanti più comunemente presenti, quali nichel, mercurio, cadmio, piombo, arsenico e cromo sia nelle acque e sia nei sedimenti.**

L'eventuale presenza di livelli di fondo dei metalli in concentrazione superiore a quella degli SQA (*standard di qualità ambientali*), riportati nelle tabelle del succitato decreto, potrà comportare una diversa classificazione dello stato chimico dei corpi idrici marino-costieri.

Sigle e abbreviazioni

ARPAT	Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana
ICRAM	Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare
APAT	Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici
IRSA CNR	Istituto di Ricerca Sulle Acque – Consiglio Nazionale delle Ricerche