

## Introduzione

Nell'ambito del piano di caratterizzazione ambientale dell'area marina costiera prospiciente il sito di bonifica di interesse nazionale "Cogoletto Stoppani" è stata effettuata la presente indagine ecotossicologica al fine di valutare la pericolosità dei sedimenti marini. Tale indagine ha previsto l'impiego di una batteria di saggi biologici formata da specie appartenenti a gruppi sistematici, categorie trofiche e sensibilità ai contaminanti diversi, comprendente il batterio *Vibrio fischeri*, l'echinoderma *Paracentrotus lividus* e l'anfipode *Corophium orientale*. E' stato effettuato, inoltre, un test per la valutazione del bioaccumulo di alcuni metalli (As, Cr, Ni e Zn) mediante l'utilizzo del polichete nereide *Hediste diversicolor*.

Il campionamento del sedimento è stato effettuato mediante una benna van Veen calata a mano e prelevando la porzione superficiale del sedimento. I campioni sono stati posti all'interno di contenitori in polietilene a chiusura ermetica e conservati alla temperatura di 4 - 5 °C fino alla preparazione delle matrici, completata entro una settimana dal campionamento.

Le matrici considerate sono state le seguenti:

1. sedimento tal quale per il saggio con *C. orientale* e per il test di bioaccumulo con *H. diversicolor*;
2. sedimento privato dell'acqua interstiziale per il saggio con *V. fischeri*;
3. elutriato per i saggi *V. fischeri* e *P. lividus*.

I saggi biologici sono stati eseguiti sulla matrice fresca ad eccezione del saggio con *P. lividus* che è stato eseguito sull'elutriato congelato a -18 °C.

Le stazioni scelte per le analisi ecotossicologiche (CG2, CG6, CG33, CG49, CG72, CG76, CG85, CG95, CG104, CG111) sono evidenziate nella figura alla pagina successiva.

## Capitolo 1 - Metodiche delle analisi ecotossicologiche

---

Si riportano di seguito le metodiche impiegate per l'esecuzione dei saggi biologici e del test di bioaccumulo.

### 1.1 - Metodiche del saggio biologico con *Vibrio fischeri*

#### Elutriato

Il saggio è stato eseguito utilizzando acqua di mare sintetica EPA al 3,3 % sia come controllo che diluente. L'elutriato è stato ottenuto mantenendo in energica agitazione per un'ora a temperatura ambiente un'aliquota di sedimento umido diluito in acqua di mare sintetica (formula EPA) in rapporto 1:4 peso secco/volume. Tale campione è stato successivamente centrifugato e il sovranatante, dopo filtrazione, è stato utilizzato per il saggio.

Il risultato del test tossicologico, eseguito in 5 repliche e con 2 letture, viene espresso come differenza percentuale della bioluminescenza del campione ad una concentrazione del 90% rispetto al controllo (acqua di mare sintetica). La significatività della differenza è stata valutata mediante il test T di Student.

Il giudizio qualitativo è stato formulato in base alla scala di tossicità riportata più avanti.

#### Fase solida

La fase solida è stata ottenuta per centrifugazione refrigerata (3.500 rpm x 30 minuti a 4 °C). Il saggio è stato applicato sui sedimenti freschi, conservati a 4 - 6 °C, utilizzando acqua di mare sintetica come controllo e diluente.

Il risultato del saggio è stato espresso sia in TU (Unità Tossiche = 100/EC<sub>50</sub>) che consente di ottenere una relazione diretta fra tossicità acuta e riduzione della bioluminescenza, sia come Sediment Toxicity Index (S.T.I.) che permette di esprimere la reale tossicità acuta del campione rispetto ad un campione ipotetico di riferimento con le medesime caratteristiche granulometriche.

Poiché il test in fase solida viene effettivamente applicato sulla frazione granulometrica < 1 mm e poiché la componente naturale della tossicità è funzione della frazione pelitica è stata eseguita un'analisi granulometrica mirata ad individuare la proporzione tra le due frazioni citate.

Il giudizio qualitativo dei campioni relativamente alla fase solida è stato espresso adottando la seguente scala di tossicità:

Scala di tossicità adottata nel saggio con *Vibrio fischeri* per l'elutriato e la fase solida

| FASE SOLIDA<br>(S.T.I.) | ELUTRIATO<br>Variatz. biolumin. (%) | Tossicità |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------|
| STI $\leq$ 1            | $\Delta b \leq 5$                   | Assente   |
| 1 < STI $\leq$ 3        | 5 < $\Delta b \leq 20$ e p < 0,05   | Bassa     |
| STI > 3                 | $\Delta b > 20$ e p < 0,05          | Alta      |

## 1.2 - Metodiche del saggio biologico con *Corophium orientale*

Il principio del saggio biologico, consiste nell'esporre per un determinato periodo un numero definito di organismi al sedimento tal quale per valutarne l'eventuale mortalità.

La durata del saggio è funzione del tipo di tossicità (a breve termine o a più lungo termine) da rilevare. In particolare si considera come tossicità a breve termine la mortalità degli organismi dopo 10 giorni di incubazione e come tossicità a più lungo termine la mortalità dopo 28 giorni. Il saggio a 28 giorni può essere considerato come un'estensione della tradizionale durata del test a 10 giorni in modo da rendere più sensibile il saggio stesso poiché i contaminanti presenti nel sedimento hanno un periodo maggiore per interagire con gli organismi.

### Campionamento organismi

Gli anfipodi sono stati campionati setacciando il loro sedimento nativo ed immediatamente trasportati in laboratorio dove sono stati selezionati in base alla taglia in modo da considerare per il saggio solo organismi di taglia omogenea (2 - 4 mm) aventi presumibilmente la stessa sensibilità alle sostanze tossiche. Con questa selezione si scartano gli individui giovanili di piccola taglia e quelli di elevata lunghezza (adulti, femmine ovigere). Gli anfipodi selezionati, sono stati trasferiti in un recipiente ed acclimatati alle condizioni di laboratorio:

- Luce = continua;
- Ossigeno disciolto = > 60 %
- Temperatura =  $16 \pm 2$  °C;
- Salinità = raggiungimento della salinità del campione da testare;

### Procedura del saggio

Per l'allestimento dei saggi biologici sono stati introdotti circa 200 cc di sedimento da testare all'interno di beaker da litro al quale sono stati aggiunti circa 750 cc di acqua di mare filtrata. Per

ogni campione sono state allestite quattro repliche e in ogni beaker sono stati inseriti 25 individui. Il numero di anfipodi presente in ogni beaker è stato verificato mediante un ulteriore conteggio.

All'inizio e al termine del test sono stati registrati alcuni parametri chimico-fisici (pH, Temperatura, Salinità, Nitrati ed Ossigeno disciolto), fonte di possibili stress per gli organismi, al fine di assicurare la buona qualità del saggio biologico.

Alla fine del 10° e 28° giorno, il sedimento (da testare e di controllo) è stato setacciato per recuperare gli organismi che sono stati classificati come vivi o morti. Gli anfipodi sono stati considerati morti se dopo una leggera stimolazione non mostravano alcun movimento degli arti.

Per ogni set di organismi impiegati è stato calcolato anche il valore di 96h-LC50 con una sostanza tossica di riferimento al fine di valutare l'omogeneità della sensibilità degli anfipodi utilizzati nelle varie prove. La 96h-LC50 è la concentrazione della sostanza tossica che determina la morte del 50 % degli organismi dopo 96 ore di esposizione. Il tossico di riferimento impiegato è stato il  $\text{CdCl}_2$  e la LC50 è stata calcolata con il metodo Maximun Likelihood-Probit a cui è stata applicata la correzione di Abbott.

### **Analisi dei dati ed elaborazioni statistiche**

Il saggio biologico è considerato valido quando la mortalità media all'interno del sedimento di controllo è  $\leq 15\%$  e quando la mortalità nella singola replica per l'intero periodo di esposizione è  $\leq 20\%$ . È stata calcolata la percentuale media ( $\pm$  la deviazione standard) degli anfipodi morti nel periodo di esposizione considerato, sia nei sedimenti da testare sia nel sedimento di controllo. I dati di mortalità di ogni campione sono quindi confrontati con quelli del sedimento di controllo. Inizialmente i dati sono stati testati per verificare la distribuzione normale mediante *Shapiro-Wilk test*. Se la distribuzione risulta normale è stato applicato il test T di Student per verificare l'eventuale differenza statistica ( $p < 0,05$ ) tra gli organismi morti nel sedimento da testare e quelli morti nel sedimento di controllo. Prima di applicare il test T, è stata verificata l'omogeneità delle varianze per scegliere il tipo di test T più opportuno. Nel caso in cui i dati non seguono una distribuzione normale è stato impiegato il test non parametrico Wilcoxon's Rank Sum Test.

### **Criterio di valutazione della tossicità**

La valutazione della tossicità, riportata nella tabella seguente, è stata eseguita prendendo in considerazione due parametri:

1. la mortalità ritrovata nei campioni da saggiare corretta con Abbott ( $\Delta m$ );
2. la differenza statistica ( $p < 0,05$ ) fra il numero di individui morti nel sedimento da analizzare e quelli morti nel sedimento di controllo.

Scala di tossicità relativa a *C. orientale*.

| Mortalità (%)              | Tossicità |
|----------------------------|-----------|
| $\Delta m < 15$            | Assente   |
| $15 \leq \Delta m \leq 25$ | Bassa     |
| $\Delta m > 25$            | Alta      |

### 1.3 - Metodiche del saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

Il saggio biologico è basato sulla fecondazione delle uova da parte di un numero definito di gameti maschili dopo che sono stati esposti alla matrice da testare (elutriato), valutando l'efficacia della fecondazione rispetto al controllo (acqua di mare naturale filtrata).

#### Preparazione dell'elutriato

L'elutriato è stato preparato miscelando acqua di mare naturale filtrata, proveniente da aree marine non impattate, con il sedimento umido da testare in rapporto 1:4 (peso secco sedimento: peso acqua). Le sospensioni ottenute sono state poste in agitazione per 1 h a temperatura ambiente e centrifugate per 20' a 3000 rpm. Il test è stato eseguito sulle seguenti diluizioni dell'elutriato: 100%, 50%, 25% effettuando per ogni campione tre repliche.

#### Procedimento del test

I ricci di mare sono stati prelevati in aree relativamente incontaminate, lontane da fonti di inquinamento antropico, trasportati in laboratorio e mantenuti in un acquario refrigerato per alcuni giorni per l'acclimatazione.

I gameti sono stati recuperati mediante l'iniezione di circa 0,5 ml di KCl 1M. I gameti maschili sono stati prelevati "a secco" mentre i femminili sono stati recuperati in acqua di mare. Prima di procedere all'esecuzione del test è stata valutata la qualità dei gameti: motilità e potere fecondante per lo sperma e forma, colore e fecondabilità per le uova. Tutta la procedura del test, dalla conservazione degli animali, all'emissione dei gameti, all'esecuzione del saggio è stata condotta alla temperatura di 16-18 °C. I gameti sono stati conteggiati ed opportunamente diluiti in modo da raggiungere un rapporto ottimale sperma-uovo di 15.000:1 per ogni provetta.

Lo sperma è stato esposto alle varie diluizioni dell'elutriato per 60', dopodiché sono state aggiunte le uova. Per la prova di fecondazione il test è stato bloccato con formaldeide dopo 20' dall'aggiunta delle uova mentre per lo studio dello sviluppo larvale, il saggio biologico è stato bloccato dopo circa 48 h cioè fino al raggiungimento del normale stadio di pluteo nel controllo.

All'inizio del test sono stati monitorati alcuni parametri chimico-fisici degli elutriati che potevano influire negativamente sul risultato delle prove verificando che rientrassero nel seguente range di accettabilità:

- temperatura (16-18 °C);
- salinità (34-36 ‰);
- ossigeno disciolto (> 60 %);
- pH (7,8 ± 0,3);
- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0-1 mg/l).

### Stima della tossicità

Al fine di considerare la percentuale di uova che nel controllo non vengono fecondate (test di fecondazione) o non arrivano a pluteo (test di sviluppo), è stata calcolata la "correzione di Abbott", mediante la seguente formula:

$$\text{Correzione Abbott} = \frac{X - Y}{100 - Y} \cdot 100$$

X = % di uova non fecondate nel campione da testare;

Y = % di uova non fecondate nel controllo.

La tossicità dei sedimenti è stata stimata sulla base dei valori di EC20 calcolata con il metodo Trimmed Spearman-Kärber. Per semplicità di comprensione, la scala di tossicità adottata è stata espressa in TU20 (100/EC20) ed è riportata di seguito:

| Effetto          | Tossicità |
|------------------|-----------|
| TU20 ≤ 1,0       | Assente   |
| 1,0 < TU20 < 1,5 | Bassa     |
| TU20 ≥ 1,5       | Alta      |

Un campione viene classificato con tossicità presente (bassa o alta) qualora sia possibile calcolare una EC20 (TU20 > 1) viceversa si ha assenza di tossicità se il valore di EC20 è maggiore o uguale a 100 % (TU ≤ 1).

#### 1.4 - Metodiche del test di bioaccumulo con *Hediste diversicolor*

La procedura adottata deriva dall'integrazione di metodologie e ricerche sperimentali sviluppate da ICRAM (Roma), CIBM (Livorno), CNR (Istituto di Biofisica, Pisa) e dall'Università di Venezia.

Gli organismi-test (selvatici) sono stati prelevati mediante setacciatura del sedimento in cui vivono (setaccio con maglia di 750  $\mu\text{m}$ ) e trasportati in laboratorio dove sono stati fatti spurgare per eliminare il sedimento presente nel tubo digerente. A tal fine, gli organismi sono stati mantenuti in ambiente termostato a  $16 \pm 2$  °C, in condizioni di illuminazione naturale, in vaschette areate contenenti sabbia quarzifera e acqua di mare, per almeno tre giorni. Il completamento della fase di spurgo è stata verificata mediante osservazione della presenza di sedimento all'interno del tubo digerente.

Gli organismi spurgati sono stati quindi prelevati, congelati e successivamente analizzati in pool di 15-20 individui per rilevare i valori di background dei contaminanti presenti nei loro tessuti (concentrazione al "tempo zero").

Il sedimento da testare (circa 300 ml) è stato posto in beaker da 1 litro contenenti circa 500 ml di acqua di mare filtrata. Prima di aggiungere gli organismi, nell'acqua sono stati controllati i seguenti parametri chimico-fisici: pH, temperatura, ossigeno disciolto, salinità e nitrati.

Per ogni campione di sedimento da testare (compreso il sedimento di controllo che è rappresentato dal sedimento nativo) sono state effettuate 3 repliche di 5 individui ciascuna.

I beaker sono stati areati per tutta la durata del test, al fine di garantire una sufficiente ossigenazione, regolando il flusso d'aria in modo da ottenere una turbolenza minima.

Per l'intera durata del test gli organismi sono stati mantenuti alla temperatura di  $16 \pm 2$  °C, in condizioni di illuminazione naturale e senza alcun tipo di alimentazione.

Alla fine del test, dopo 28 giorni, gli organismi sono stati recuperati, ripuliti dai residui di sedimento e di muco e tenuti a spurgare per 3 - 5 giorni in sabbia quarzifera.

Successivamente sono state effettuate le operazioni necessarie alla determinazione dei metalli accumulati negli organismi: i policheti sono stati, quindi, essiccati a 60 °C e successivamente sono stati macinati in mortaio. Sono stati poi mineralizzati 10-30 mg di campione con 2 cc di  $\text{HNO}_3$  sovrapuro al 65% e 1 cc di  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% in digestore a microonde e si è provveduto alla lettura della concentrazione di As, Cr, Ni e Zn in AAS in fornetto di grafite. In tabella sono riportate le percentuali di recupero rispetto al materiale certificato (CRM 278).

| Metallo      | As   | Cr   | Ni   | Zn   |
|--------------|------|------|------|------|
| Recupero (%) | 97,2 | 96,2 | 97,5 | 98,8 |

## Capitolo 2 - Risultati analisi ecotossicologiche

### 2.1 – Saggio biologico con *V. fischeri*

Si riportano di seguito i risultati relativi alla fase solida del sedimento e all'elutriato.

#### Fase solida

Non è stato possibile effettuare il saggio biologico sui campioni CG72, CG85, CG95 e CG111 poiché la natura granulometrica del sedimento è risultata troppo grossolana.

| Camp.   | Sabbia < 1mm (%) | Frazione < 63 µm (%) | Tox Naturale (TU) | Soglia Tox Stimata (TU) |
|---------|------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| CG2     | 97,66            | 2,34                 | 7                 | 8                       |
| CG6     | 40,60            | 59,40                | 162               | 208                     |
| CG33    | 89,03            | 10,97                | 30                | 39                      |
| CG49    | 73,98            | 26,02                | 71                | 91                      |
| CG72 *  | -                | -                    | -                 | -                       |
| CG76    | 77,42            | 22,58                | 62                | 79                      |
| CG85 *  | -                | -                    | -                 | -                       |
| CG95 *  | -                | -                    | -                 | -                       |
| CG104   | 89,53            | 10,47                | 29                | 37                      |
| CG111 * | -                | -                    | -                 | -                       |

\* saggio non eseguibile per incompatibilità granulometrica

| Camp. | Tox Misurata (TU) | Limiti di confidenza al 95% (TU) | R <sup>2</sup> (%) | S.T.I. | TOX |
|-------|-------------------|----------------------------------|--------------------|--------|-----|
| CG2   | 2                 | 2 – 2                            | 99,88              | 0,23   |     |
| CG6   | 80                | 69 – 94                          | 98,64              | 0,39   |     |
| CG33  | 19                | 11 – 35                          | 96,33              | 0,50   |     |
| CG49  | 12                | 7 – 21                           | 98,01              | 0,13   |     |
| CG76  | 17                | 12 - 23                          | 96,38              | 0,21   |     |
| CG104 | 8                 | 6 - 11                           | 98,70              | 0,23   |     |

Tutti i campioni che è stato possibile analizzare non mostrano tossicità acuta.



## Elutriato

| Camp. | Incubazione: 5'                               |               | Incubazione: 15'                              |               |
|-------|---|---------------|---|---------------|
|       | $\Delta$ biol. (%)<br>(limiti confid. al 95%) | Test t<br>(p) | $\Delta$ biol. (%)<br>(limiti confid. al 95%) | Test t<br>(p) |
| CG2   | 9,52 (5,95 – 13,10)                           | <0,05         | 9,92 (7,02 – 12,82)                           | <0,05         |
| CG6   | -1,36 (-6,85 – 4,13)                          | 0,863         | 0,89 (-7,11 – 8,90)                           | 0,415         |
| CG33  | 6,52 (1,40 – 11,78)                           | <0,05         | 6,99 (1,86 – 12,12)                           | <0,05         |
| CG49  | 4,84 (-1,69 – 11,38)                          | <0,05         | 6,34 (-0,27 – 12,95)                          | <0,05         |
| CG72  | 3,94 (-1,85 – 9,73)                           | <0,05         | -1,09 (-13,80 – 11,61)                        | 0,617         |
| CG76  | 3,33 (-4,26 – 10,91)                          | <0,05         | 2,835 (-6,68 – 12,35)                         | 0,099         |
| CG85  | 6,25 (-1,09 – 13,59)                          | 0,352         | 10,20 (2,13 – 18,27)                          | <0,05         |
| CG95  | 3,98 (-0,31 – 8,27)                           | 0,401         | 4,34 (-4,85 – 13,54)                          | 0,321         |
| CG104 | 2,04 (-0,87 – 4,95)                           | <0,05         | 3,86 (2,16 – 5,56)                            | <0,05         |
| CG111 | -1,15 (-4,73 – 2,43)                          | 0,609         | -1,42 (-5,60 – 2,77)                          | 0,510         |

| Campione | $\Delta$ bioluminescenza media<br>(%) | TOX    |
|----------|---------------------------------------|--------|
| CG2      | 9,72 $\pm$ 0,28                       | Yellow |
| CG6      | -0,23 $\pm$ 1,59                      | Green  |
| CG33     | 6,79 $\pm$ 0,28                       | Yellow |
| CG49     | 5,59 $\pm$ 1,06                       | Yellow |
| CG72     | 1,43 $\pm$ 3,56                       | Green  |
| CG76     | 3,08 $\pm$ 0,35                       | Green  |
| CG85     | 8,22 $\pm$ 2,80                       | Yellow |
| CG95     | 4,16 $\pm$ 0,25                       | Green  |
| CG104    | 2,95 $\pm$ 1,29                       | Green  |
| CG111    | -1,28 $\pm$ 0,19                      | Green  |

Una bassa tossicità è stata ritrovata nei campioni CG2, CG33, CG49 e CG85; nei rimanenti campioni si ha assenza di tossicità.

## 2.2 - Saggio biologico con *C. orientale*

Il valore di LC50 nei confronti del cloruro di cadmio a 96 h è risultato pari a 3,95 (3,29 – 4,74) mg /l che rientra all'interno della carta di controllo di questo saggio biologico.

### Mortalità dopo 10 giorni

Si riportano di seguito i risultati del saggio biologico dopo 10 giorni di esposizione al sedimento (tossicità acuta).

| Campione         | N° morti |    |    |    | Mort. Media<br>(% ± dev. st.) | Mort. Corretta<br>(%) | Tossicità<br>(10 giorni) |
|------------------|----------|----|----|----|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <b>Controllo</b> | 1        | 0  | 1  | 0  | 2 ± 2,3                       | <b>0,0</b>            |                          |
| <b>CG2</b>       | 14       | 12 | 12 | 15 | 53 ± 6,0                      | <b>52,0</b>           |                          |
| <b>CG6</b>       | 9        | 8  | 7  | 9  | 33 ± 3,8                      | <b>31,6</b>           |                          |
| <b>CG33</b>      | 12       | 8  | 9  | 14 | 43 ± 11,0                     | <b>41,8</b>           |                          |
| <b>CG49</b>      | 12       | 8  | 10 | 6  | 36 ± 10,3                     | <b>34,7</b>           |                          |
| <b>CG72</b>      | 4        | 3  | 8  | 6  | 21 ± 8,9                      | <b>19,4</b>           |                          |
| <b>CG76</b>      | 4        | 1  | 3  | 6  | 14 ± 8,3                      | <b>12,2</b>           |                          |
| <b>CG85</b>      | 7        | 13 | 14 | 7  | 41 ± 15,1                     | <b>39,8</b>           |                          |
| <b>CG95</b>      | 8        | 6  | 3  | 4  | 21 ± 8,9                      | <b>19,4</b>           |                          |
| <b>CG104</b>     | 0        | 6  | 6  | 4  | 16 ± 11,3                     | <b>14,3</b>           |                          |
| <b>CG111</b>     | 1        | 2  | 4  | 1  | 8 ± 5,7                       | <b>6,1</b>            |                          |

Il saggio biologico con *C. orientale* a 10 giorni per la determinazione della tossicità acuta evidenzia una situazione di elevata tossicità nelle stazioni CG2, CG6, CG33, CG49 e CG85, di bassa tossicità nelle stazioni CG72 e CG95 mentre non è stata ritrovata tossicità nelle stazioni CG76, CG104 e CG111.

**Mortalità dopo 28 giorni**

Si riportano di seguito i risultati del saggio biologico dopo 28 giorni di esposizione al sedimento (tossicità a lungo termine).

| Campione         | N° morti |    |    |    | Mort. Media<br>(% ± dev. st.) | Mort. Corretta<br>(%) | Tossicità<br>(28 giorni) |
|------------------|----------|----|----|----|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
|                  |          |    |    |    |                               |                       |                          |
| <b>Controllo</b> | 3        | 3  | 2  | 3  | 11 ± 2,0                      | <b>0,0</b>            |                          |
| <b>CG2</b>       | 19       | 15 | 13 | 18 | 65 ± 11,0                     | <b>60,7</b>           |                          |
| <b>CG6</b>       | 14       | 9  | 13 | 9  | 45 ± 10,5                     | <b>38,2</b>           |                          |
| <b>CG33</b>      | 14       | 20 | 18 | 19 | 71 ± 10,5                     | <b>67,4</b>           |                          |
| <b>CG49</b>      | 8        | 8  | 14 | 13 | 43 ± 12,8                     | <b>36,0</b>           |                          |
| <b>CG72</b>      | 14       | 15 | 14 | 15 | 58 ± 2,3                      | <b>52,8</b>           |                          |
| <b>CG76</b>      | 3        | 4  | 11 | 4  | 21 ± 14,8                     | <b>12,4</b>           |                          |
| <b>CG85</b>      | 13       | 15 | 9  | 18 | 55 ± 15,1                     | <b>49,4</b>           |                          |
| <b>CG95</b>      | 10       | 5  | 7  | 7  | 29 ± 8,2                      | <b>20,2</b>           |                          |
| <b>CG104</b>     | 13       | 13 | 10 | 10 | 46 ± 6,9                      | <b>39,3</b>           |                          |
| <b>CG111</b>     | 9        | 8  | 5  | 9  | 31 ± 7,6                      | <b>22,5</b>           |                          |

La tossicità a lungo termine valutata sulla base della mortalità degli organismi dopo 28 giorni di esposizione al sedimento rappresenta un prolungamento della tradizionale durata del saggio biologico determinando un aumento della sensibilità generale del test poiché gli organismi stanno a contatto con gli inquinanti per un periodo di tempo più lungo.

I risultati ottenuti mostrano una diffusa tossicità nell'area indagata; la maggior parte delle stazioni evidenzia una tossicità alta ad eccezione delle stazioni CG76 CG95 e CG111 che invece hanno una bassa tossicità.

Ulteriori informazioni riguardo la dinamica della tossicità, possono essere ricavate valutando l'eventuale incremento di mortalità dopo 28 giorni di incubazione nel sedimento. In altre parole si considera la significatività (test T di Student,  $p < 0,05$ ) della differenza tra gli organismi morti dopo 28 giorni e gli organismi morti dopo 10 giorni.

I dati di mortalità di ciascuna replica sono stati corretti (mediante la formula di Abbott) con i dati di mortalità del controllo, al fine di considerare anche la mortalità naturale degli organismi.

Nella tabella seguente vengono riportati i dati delle mortalità corrette ed i valori di p del test T.

| Campione | N° organismi deceduti corretti (10 giorni) |       |       |       | N° organismi deceduti corretti (28 giorni) |       |       |       | Diff. Mortalità (%) | Test T (p) | Increm. |
|----------|--|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|---------------------|------------|---------|
|          |  |       |       |       |  |       |       |       |                     |            |         |
| Cont.    | 0,51                                       | -0,51 | 0,51  | -0,51 | 0,28                                       | 0,28  | -0,84 | 0,28  | 0,0                 | 1          |         |
| CG2      | 13,78                                      | 11,73 | 11,73 | 14,80 | 18,26                                      | 13,76 | 11,52 | 17,13 | 8,6                 | 0,2577     | -       |
| CG6      | 8,67                                       | 7,65  | 6,63  | 8,67  | 12,64                                      | 7,02  | 11,52 | 7,02  | 6,6                 | 0,3319     | -       |
| CG33     | 11,73                                      | 7,65  | 8,67  | 13,78 | 12,64                                      | 19,38 | 17,13 | 18,26 | 25,6                | 0,0202     | ✓       |
| CG49     | 11,73                                      | 7,65  | 9,69  | 5,61  | 5,90                                       | 5,90  | 12,64 | 11,52 | 1,3                 | 0,8922     | -       |
| CG72     | 3,57                                       | 2,55  | 7,65  | 5,61  | 12,64                                      | 13,76 | 12,64 | 13,76 | 33,4                | 0,0004     | ✓       |
| CG76     | 3,57                                       | 0,51  | 2,55  | 5,61  | 0,28                                       | 1,40  | 9,27  | 1,40  | 0,2                 | 0,9906     | -       |
| CG85     | 6,63                                       | 12,76 | 13,78 | 6,63  | 11,52                                      | 13,76 | 7,02  | 17,13 | 9,6                 | 0,4323     | -       |
| CG95     | 7,65                                       | 5,61  | 2,55  | 3,57  | 8,15                                       | 2,53  | 4,78  | 4,78  | 0,8                 | 0,9014     | -       |
| CG104    | -0,51                                      | 5,61  | 5,61  | 3,57  | 11,52                                      | 11,52 | 8,15  | 8,15  | 25,0                | 0,0114     | ✓       |
| CG111    | 0,51                                       | 1,53  | 3,57  | 0,51  | 7,02                                       | 5,90  | 2,53  | 7,02  | 16,3                | 0,0191     | ✓       |

✓ = incremento significativo

Tabella riepilogativa delle tossicità espresse da *C. orientale*

| Campione | Tossicità 10 giorni | Tossicità 28 giorni | Incremento significativo della mortalità |
|----------|---------------------|---------------------|--|
| CG2      |                     |                     |  |
| CG6      |                     |                     |  |
| CG33     |                     |                     | ✓  |
| CG49     |                     |                     |  |
| CG72     |                     |                     | ✓  |
| CG76     |                     |                     |  |
| CG85     |                     |                     |  |
| CG95     |                     |                     |  |
| CG104    |                     |                     | ✓  |
| CG111    |                     |                     | ✓  |

Dal confronto tra il saggio biologico a 10 giorni e quello a 28 giorni, si osserva che i campioni CG2, CG6, CG33, CG49, CG85 presentano un'elevata tossicità sia a breve che a lungo termine. In questi campioni l'elevata tossicità che si riscontra a lungo termine deriva essenzialmente dalla mortalità nei primi 10 giorni, ad eccezione del campione CG33 in cui si osserva un incremento significativo della mortalità tra i 10 e 28 giorni.

Un incremento significativo della mortalità tra i 10 e 28 giorni si osserva anche nei campioni CG72, CG104 e CG111 sia pur con tossicità diverse. In particolare per i campioni CG104 e CG111 si potrebbe ipotizzare che i contaminanti presenti nei sedimenti manifestino la loro tossicità dopo certi livelli di accumulo. Ciò potrebbe essere attribuito alle forme chimico-fisiche dei metalli presenti in questi campioni, in cui è stato osservato l'accumulo più elevato nel test con *H. diversicolor*, riportato successivamente.

I rimanenti campioni CG76 e CG95 presentano rispettivamente una tossicità assente e bassa sia a 10 che a 28 giorni.

## 2.3 - Saggio biologico con *P. lividus*

I gameti impiegati per l'esecuzione del saggio biologico forniscono una EC50 nei confronti del rame pari a 24,69 (19,48 – 31,30) mg/l che rientra all'interno della carta di controllo. Si presentano di seguito i risultati della tossicità acuta (saggio di fecondazione) e della tossicità a lungo termine (saggio di sviluppo).

### Fecondazione

| Camp.         | Dil. (%) | N° uova fecondate |    |    | Media fec. (%) | Media non fec. (%) | Media non fec. corretta (%) |
|---------------|----------|-------------------|----|----|----------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>Contr.</b> | -        | 87                | 88 | 89 | 88,0           | 12,0 ± 1,0         | 0,0                         |
| <b>CG2</b>    | 100      | 58                | 56 | 56 | 56,7           | 43,3 ± 1,2         | 35,6                        |
|               | 50       | 67                | 69 | 69 | 68,3           | 31,7 ± 1,2         | 22,3                        |
|               | 25       | 77                | 76 | 75 | 76,0           | 24,0 ± 1,0         | 13,6                        |
| <b>CG6</b>    | 100      | 60                | 63 | 61 | 61,3           | 38,7 ± 1,5         | 30,3                        |
|               | 50       | 74                | 75 | 74 | 74,3           | 25,7 ± 0,6         | 15,5                        |
|               | 25       | 79                | 82 | 81 | 80,7           | 19,3 ± 1,5         | 8,3                         |
| <b>CG33</b>   | 100      | 57                | 59 | 59 | 58,3           | 41,7 ± 1,2         | 33,7                        |
|               | 50       | 73                | 69 | 71 | 71,0           | 29,0 ± 2,0         | 19,3                        |
|               | 25       | 79                | 80 | 78 | 79,0           | 21,0 ± 1,0         | 10,2                        |
| <b>CG49</b>   | 100      | 61                | 62 | 59 | 60,7           | 39,3 ± 1,5         | 31,1                        |
|               | 50       | 74                | 72 | 72 | 72,7           | 27,3 ± 1,2         | 17,4                        |
|               | 25       | 82                | 80 | 82 | 81,3           | 18,7 ± 1,2         | 7,6                         |
| <b>CG72</b>   | 100      | 66                | 64 | 64 | 64,7           | 35,3 ± 1,2         | 26,5                        |
|               | 50       | 74                | 76 | 75 | 75,0           | 25,0 ± 1,0         | 14,8                        |
|               | 25       | 80                | 81 | 82 | 81,0           | 19,0 ± 1,0         | 8,0                         |
| <b>CG76</b>   | 100      | 67                | 69 | 69 | 68,3           | 31,7 ± 1,2         | 22,3                        |
|               | 50       | 77                | 77 | 78 | 77,3           | 22,7 ± 0,6         | 12,1                        |
|               | 25       | 81                | 83 | 83 | 82,3           | 17,7 ± 1,2         | 6,4                         |
| <b>CG85</b>   | 100      | 39                | 42 | 40 | 40,3           | 59,7 ± 1,5         | 54,2                        |
|               | 50       | 65                | 67 | 65 | 65,7           | 34,3 ± 1,2         | 25,4                        |
|               | 25       | 75                | 72 | 74 | 73,7           | 26,3 ± 1,5         | 16,3                        |
| <b>CG95</b>   | 100      | 62                | 64 | 64 | 63,3           | 36,7 ± 1,2         | 28,0                        |
|               | 50       | 63                | 65 | 64 | 64,0           | 36,0 ± 1,0         | 27,3                        |
|               | 25       | 79                | 88 | 81 | 82,7           | 17,3 ± 4,7         | 6,1                         |
| <b>CG104</b>  | 100      | 65                | 66 | 64 | 65,0           | 35,0 ± 1,0         | 26,1                        |
|               | 50       | 72                | 69 | 70 | 70,3           | 29,7 ± 1,5         | 20,1                        |
|               | 25       | 84                | 85 | 83 | 84,0           | 16,0 ± 1,0         | 4,5                         |
| <b>CG111</b>  | 100      | 71                | 70 | 69 | 70,0           | 30,0 ± 1,0         | 20,5                        |
|               | 50       | 75                | 76 | 76 | 75,7           | 24,3 ± 0,6         | 14,0                        |
|               | 25       | 82                | 82 | 81 | 81,7           | 18,3 ± 0,6         | 7,2                         |

I valori di EC20 e TU20 per l'attribuzione della classe di tossicità sono riportati nella seguente tabella:

| Campione     | EC20 (%) | TU20 | Tossicità fecondazione |
|--------------|----------|------|------------------------|
| <b>CG2</b>   | 45,51    | 2,20 |                        |
| <b>CG6</b>   | 61,05    | 1,64 |                        |
| <b>CG33</b>  | 51,16    | 1,95 |                        |
| <b>CG49</b>  | 59,21    | 1,69 |                        |
| <b>CG72</b>  | 69,12    | 1,45 |                        |
| <b>CG76</b>  | 87,55    | 1,14 |                        |
| <b>CG85</b>  | 32,63    | 3,06 |                        |
| <b>CG95</b>  | 55,26    | 1,81 |                        |
| <b>CG104</b> | 66,68    | 1,50 |                        |
| <b>CG111</b> | 91,67    | 1,09 |                        |

Una tossicità acuta è evidente in tutte le stazioni; i campioni CG72, CG76, CG104 e CG111 mostrano una bassa tossicità.

## Sviluppo

| Camp.         | Dil.<br>(%) | N° embrioni non sviluppati |     |     | Media svilupp.<br>(%) | Media non svilupp.<br>(%) | Media non svilupp.<br>corretta (%) |
|---------------|-------------|----------------------------|-----|-----|-----------------------|---------------------------|------------------------------------|
| <b>Contr.</b> |             | 10                         | 8   | 7   | 91,7                  | 8,3                       | 0,0                                |
| <b>2</b>      | 100         | 54                         | 52  | 53  | 47,0                  | 53,0                      | 48,7                               |
|               | 50          | 44                         | 42  | 42  | 57,3                  | 42,7                      | 37,5                               |
|               | 25          | 22                         | 24  | 22  | 77,3                  | 22,7                      | 15,6                               |
| <b>6</b>      | 100         | 48                         | 49  | 48  | 51,7                  | 48,3                      | 43,6                               |
|               | 50          | 27                         | 28  | 27  | 72,7                  | 27,3                      | 20,7                               |
|               | 25          | 21                         | 19  | 17  | 81,0                  | 19,0                      | 11,6                               |
| <b>33</b>     | 100         | 68                         | 65  | 70  | 32,3                  | 67,7                      | 64,7                               |
|               | 50          | 30                         | 26  | 28  | 72,0                  | 28,0                      | 21,5                               |
|               | 25          | 14                         | 13  | 13  | 86,7                  | 13,3                      | 5,5                                |
| <b>49</b>     | 100         | 100                        | 100 | 100 | 0,0                   | 100,0                     | 100,0                              |
|               | 50          | 43                         | 42  | 43  | 57,3                  | 42,7                      | 37,5                               |
|               | 25          | 22                         | 23  | 21  | 78,0                  | 22,0                      | 14,9                               |
| <b>72</b>     | 100         | 39                         | 34  | 36  | 63,7                  | 36,3                      | 30,5                               |
|               | 50          | 26                         | 28  | 28  | 72,7                  | 27,3                      | 20,7                               |
|               | 25          | 13                         | 12  | 13  | 87,3                  | 12,7                      | 4,7                                |
| <b>76</b>     | 100         | 76                         | 78  | 76  | 23,3                  | 76,7                      | 74,5                               |
|               | 50          | 28                         | 29  | 29  | 71,3                  | 28,7                      | 22,2                               |
|               | 25          | 21                         | 17  | 20  | 80,7                  | 19,3                      | 12,0                               |
| <b>85</b>     | 100         | 100                        | 100 | 100 | 0,0                   | 100,0                     | 100,0                              |
|               | 50          | 32                         | 29  | 30  | 69,7                  | 30,3                      | 24,0                               |
|               | 25          | 18                         | 19  | 19  | 81,3                  | 18,7                      | 11,3                               |
| <b>95</b>     | 100         | 28                         | 28  | 30  | 71,3                  | 28,7                      | 22,2                               |
|               | 50          | 26                         | 25  | 27  | 74,0                  | 26,0                      | 19,3                               |
|               | 25          | 20                         | 19  | 18  | 81,0                  | 19,0                      | 11,6                               |
| <b>104</b>    | 100         | 21                         | 29  | 29  | 73,7                  | 26,3                      | 19,6                               |
|               | 50          | 81                         | 21  | 19  | 81,7                  | 18,3                      | 10,9                               |
|               | 25          | 86                         | 15  | 14  | 86,0                  | 14,0                      | 6,2                                |
| <b>111</b>    | 100         | 21                         | 23  | 22  | 78,0                  | 22,0                      | 14,9                               |
|               | 50          | 15                         | 15  | 16  | 84,7                  | 15,3                      | 7,6                                |
|               | 25          | 14                         | 12  | 12  | 87,3                  | 12,7                      | 4,7                                |



I valori di EC20 e TU20 per l'attribuzione della classe di tossicità sono riportati nella seguente tabella:

| Campione | EC20 (%) | TU20 | Tossicità sviluppo |
|----------|----------|------|--------------------|
| CG2      | 28,99    | 3,45 | Alta               |
| CG6      | 43,03    | 2,32 | Alta               |
| CG33     | 44,37    | 2,25 | Alta               |
| CG49     | 30,97    | 3,23 | Alta               |
| CG72     | 60,87    | 1,64 | Alta               |
| CG76     | 36,61    | 2,73 | Alta               |
| CG85     | 33,82    | 2,96 | Alta               |
| CG95     | 69,66    | 1,44 | Bassa              |
| CG104    | 105,00   | 0,95 | Assente            |
| CG111    | 158,64   | 0,63 | Assente            |

Dai risultati relativi allo sviluppo embrionale, la maggior parte delle stazioni presenta un'elevata tossicità mentre le stazioni CG95, CG104 e CG111 mostrano tossicità bassa o assente.

Dal confronto tra il saggio biologico di fecondazione e quello di sviluppo emerge con evidenza che nelle stazioni CG104, CG111 e, in misura minore, CG95, la tossicità si manifesta nella fase di fecondazione e poi diminuisce (CG95) o non dà più effetti rilevabili col saggio di sviluppo (CG104 e CG111).

Confrontando la tossicità a lungo termine espressa da *C. orientale* e da *P. lividus* si può osservare che c'è una generale coerenza tra i risultati ad eccezione delle stazioni CG76, CG104 e CG111 (vedi tabella riportata di seguito).

| Campione | <i>C. orientale</i><br>Tossicità 28 giorni | <i>P. lividus</i><br>Tossicità sviluppo |
|----------|--|---|
| CG2      | Alta                                       | Alta                                    |
| CG6      | Alta                                       | Alta                                    |
| CG33     | Alta                                       | Alta                                    |
| CG49     | Alta                                       | Alta                                    |
| CG72     | Alta                                       | Alta                                    |
| CG76     | Bassa                                      | Alta                                    |
| CG85     | Alta                                       | Alta                                    |
| CG95     | Bassa                                      | Bassa                                   |
| CG104    | Alta                                       | Assente                                 |
| CG111    | Bassa                                      | Assente                                 |

Considerando, inoltre, anche la tossicità acuta, si può notare che le stazioni CG104 e CG111 hanno un andamento opposto nei due saggi. In queste due stazioni, infatti, *C. orientale* non evidenzia una tossicità acuta mentre rileva un'evidente tossicità a lungo termine; viceversa *P. lividus* mette in evidenza una bassa tossicità acuta ma una completa assenza di tossicità a lungo termine.

Un'altra situazione particolare si osserva nei sedimenti della stazione CG76 con una tossicità a breve e a lungo termine assente in *C. orientale* ma presente in *P. lividus*.

## 2.4 - Valutazione complessiva della tossicità acuta

Si riporta di seguito, per ogni stazione, una tabella riepilogativa dell'esito di ciascun saggio biologico:

| Campione | <i>V. fischeri</i> |           | <i>C. orientale</i> | <i>P. lividus</i> |
|----------|--------------------|-----------|---------------------|-------------------|
|          | Fase solida        | Elutriato |                     |                   |
| G2       |                    |           |                     |                   |
| CG6      |                    |           |                     |                   |
| CG33     |                    |           |                     |                   |
| CG49     |                    |           |                     |                   |
| CG72     | n.e.               |           |                     |                   |
| CG76     |                    |           |                     |                   |
| CG85     | n.e.               |           |                     |                   |
| CG95     | n.e.               |           |                     |                   |
| CG104    |                    |           |                     |                   |
| CG111    | n.e.               |           |                     |                   |

Il criterio adottato per la valutazione è basato su un "principio di precauzione" secondo il quale basta che un solo saggio dia un responso di tossicità che la valutazione complessiva della batteria sia di tossicità.

L'analisi comparativa della tossicità acuta espressa dalla batteria di saggi biologici impiegata, quindi, evidenzia la presenza di tossicità (sia pur con diversi livelli) in tutte le stazioni considerate. Si può notare, in particolare, come il saggio biologico con *V. fischeri*, sia generalmente meno sensibile rispetto ai saggi con *C. orientale* e *P. lividus*. Quest'apparente contraddizione dimostra in realtà come la complessità dei contaminanti agisca in maniera differente sulle specie impiegate. D'altro canto si nota una certa coerenza nei risultati dei saggi con *C. orientale* e *P. lividus*.

A grandi linee si possono comunque distinguere delle stazioni con bassa tossicità da altre con più elevata tossicità: le stazioni poste verso est del sito di bonifica (CG72, CG76, CG104, CG111) presentano una tossicità più bassa rispetto alle altre.

Al fine di avere una rappresentazione cartografica della tossicità complessiva di ciascuna stazione è stato attribuito al giudizio di tossicità di ciascun saggio biologico un valore arbitrario ed è stata quindi calcolata la media dei valori di tossicità espressa dalla batteria di saggi, come riportato nelle tabelle seguenti.

| Tossicità | Valore |
|-----------|--------|
| Assente   | 0      |
| Bassa     | 1      |
| Alta      | 2      |

| Campione     | <i>V. fischeri</i> |   | <i>C. orientale</i> | <i>P. lividus</i> | media       |
|--------------|--------------------|---|---------------------|-------------------|-------------|
| <b>CG2</b>   | 0                  | 1 | 2                   | 2                 | <b>1.25</b> |
| <b>CG6</b>   | 0                  | 0 | 2                   | 2                 | <b>1.00</b> |
| <b>CG33</b>  | 0                  | 1 | 2                   | 2                 | <b>1.25</b> |
| <b>CG49</b>  | 0                  | 1 | 2                   | 2                 | <b>1.25</b> |
| <b>CG72</b>  | <i>n.e.</i>        | 0 | 1                   | 1                 | <b>0.67</b> |
| <b>CG76</b>  | 0                  | 0 | 0                   | 1                 | <b>0.25</b> |
| <b>CG85</b>  | <i>n.e.</i>        | 1 | 2                   | 2                 | <b>1.67</b> |
| <b>CG95</b>  | <i>n.e.</i>        | 0 | 1                   | 2                 | <b>1.00</b> |
| <b>CG104</b> | 0                  | 0 | 0                   | 1                 | <b>0.25</b> |
| <b>CG111</b> | <i>n.e.</i>        | 0 | 0                   | 1                 | <b>0.33</b> |

Il valore medio è stato quindi impiegato per l'elaborazione cartografica effettuata mediante GIS che è riportata di seguito.

Dalla cartina si nota l'esistenza di due zone caratterizzate da differenti tossicità: una zona con tossicità bassa ubicata verso est ed una zona con più alta tossicità posta invece nella parte occidentale del sito. In particolare si osserva come la linea di demarcazione tra la zona avente bassa tossicità e quella con alta tossicità sia posta in corrispondenza della foce del torrente Lerone. A tal proposito considerato che la principale fonte di tossicità dell'area è costituita dagli scarichi del torrente, si potrebbe ipotizzare che questi una volta giunti al mare vengano trasportati dalla corrente litoranea in direzione ovest.

L'elevata tossicità del campione CG49 potrebbe essere attribuita alla deposizione dei solidi sospesi trasportati dall'effluente durante periodi in cui il drift costiero è di minore intensità.

## 2.5 - Test di bioaccumulo con *H. diversicolor*

Si riportano di seguito gli esiti analitici relativi al bioaccumulo di arsenico, cromo, nichel e zinco nel polichete *H. diversicolor*.

| Campione     | As<br>(mg/kg) | Cr<br>(mg/kg) | Ni<br>(mg/kg) | Zn<br>(mg/kg) |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Cont.</b> | 1,50          | 0,95          | 3,30          | 173,5         |
| <b>CG2</b>   | 3,11          | n.r.          | n.r.          | 131,7         |
| <b>CG6</b>   | 2,45          | 0,60          | 1,63          | 136,0         |
| <b>CG33</b>  | 0,85          | 0,49          | 1,29          | 122,7         |
| <b>CG49</b>  | n.r.          | n.r.          | n.r.          | 142,3         |
| <b>CG72</b>  | 0,78          | 0,57          | 1,01          | 156,2         |
| <b>CG76</b>  | 0,90          | 3,88          | 1,60          | 140,4         |
| <b>CG85</b>  | n.r.          | n.r.          | n.r.          | 123,6         |
| <b>CG95</b>  | 1,52          | 6,25          | 2,69          | 119,1         |
| <b>CG104</b> | 2,20          | 8,71          | 6,16          | 137,2         |
| <b>CG111</b> | 3,40          | 7,40          | 4,98          | 134,3         |

n.r. = non rilevabile

Nei campioni CG2, CG49, CG85, a causa dell'elevata tossicità dei sedimenti, gli organismi sopravvissuti non hanno consentito di avere i risultati analitici di alcuni elementi.

Dei quattro metalli analizzati, un evidente bioaccumulo di cromo è stato osservato nelle stazioni CG95, CG104, CG111 e in misura minore nella stazione CG76 attribuibile, probabilmente, alla presenza di maggiori concentrazioni del metallo in forme chimico-fisiche biodisponibili.

## Conclusioni

I risultati ottenuti con la batteria di saggi biologici impiegata, evidenziano che l'area marina costiera oggetto della presente indagine è caratterizzata da una diffusa tossicità acuta attribuibile agli scarichi del torrente Lerone. La tossicità più alta si riscontra ad ovest della foce ed è probabilmente causata dal trasporto in questa direzione degli scarichi del torrente, dovuto al drift costiero.

Di fronte alla foce si osserva, inoltre, un maggior accumulo di cromo nel polichete *H. diversicolor* che potrebbe indicare una concentrazione più elevata nei sedimenti di specie chimiche più biodisponibili.