



**ARPAT**

Agenzia regionale  
per la protezione ambientale  
della Toscana

**Realizzazione indagine  
ecotossicologica sui solidi  
sospesi presenti nello scarico in  
mare della Solvay Chimica di  
Rosignano  
Anno 2011**

INSIEME PER UN FUTURO SOSTENIBILE



**ARPAT**

Agenzia regionale  
per la protezione ambientale  
della Toscana

**Realizzazione indagine  
ecotossicologica sui solidi sospesi  
presenti nello scarico in mare della  
Solvay Chimica di Rosignano  
Anno 2011**

**Regione Toscana**



**Realizzazione indagine ecotossicologica sui solidi sospesi presenti nello scarico in mare della Solvay Chimica di Rosignano - Anno 2011**

A cura di:

*Gioia Benedettini*

ARPAT – Dip. prov. di Pisa

Autori:

*Gioia Benedettini*

ARPAT – Dip. prov. di Pisa

*Francesco Vigna Guidi,*

ARPAT – Direzione Tecnica

Collaboratori:

Andrea Bernini – Dip. prov. di Livorno

© ARPAT 2011

SE STAMPATO:

Stampato su carta che ha ottenuto il marchio di qualità ecologica dell'Unione Europea – Ecolabel

## INDICE

sintesi	6
1 Introduzione	7
2 STRATEGIA DI CAMPIONAMENTO	8
2.1 Descrizione degli scarichi	8
2.2 Punti di prelievo scarichi (analisi acque e solidi sospesi)	9
2.3 Punti di prelievo sedimenti e sabbie	10
2.4 Frequenza di campionamento	10
2.5 Tests eseguiti su le diverse matrici	10
3 Materiali e metodi	12
3.1 Tests di tossicità acuta con batteri bioluminescenti ( <i>Vibrio fischeri</i> ) su matrice solida: Metodo SPT (Solid Fase Test) e correzione pelitica – Metodo ICRAM -Appendice 2 Metodi Analitici di Riferimento – 2001	12
3.1.1 Riattivazione della sospensione batterica	12
3.1.2 Conduzione del saggio	12
3.1.3 Correzione del colore	12
3.2 Test di tossicità acuta con batteri bioluminescenti ( <i>Vibrio fischeri</i> ) su matrice liquida - Metodo: APAT IRSA CNR 8030 Manuale 29/03: 2003	13
3.2.1 Riattivazione della sospensione batterica	13
3.2.2 Conduzione del saggio	13
3.2.3 Espressione del risultato	14
3.3 Test di tossicità acuta con rotiferi ( <i>Brachionus plicatilis</i> ) su matrice liquida - Metodo: Metodo interno MI/B/05/004 secondo SOP del Rotokit M della ditta MicroBioTests Inc.	15
3.3.1 Riattivazione delle cisti	15
3.3.2 Conduzione del saggio	15
3.3.3 Espressione del risultato	16
3.4 Test di tossicità acuta con <i>Artemia</i> ( <i>Artemia sp.</i> ) su matrice liquida - Metodo: APAT IRSA CNR 8060 Manuale 29/03: 2003	16
3.4.1 Riattivazione delle cisti	16
3.4.2 Conduzione del saggio	16
3.4.3 Saggio preliminare	16
3.4.4 Saggio definitivo a 96 ore	17
3.4.5 Espressione del risultato	17
3.5 Trattamento del campione	17
3.5.1 Campioni liquidi (scarichi)	17
3.5.2 Campioni solidi (sedimenti e sabbie)	17
3.6 Classe di tossicità	19
3.6.1. Criteri per la classificazione dei sedimenti	19
4 RISULTATI	22
4.1 Risultati scarichi (analisi acque)	22
4.2 Risultati scarichi-solidi sospesi	25

4.3	<i>Risultati sedimenti e sabbie (analisi sedimenti ed elutriati)</i>	26
5	Conclusioni	32
5.1	<i>Scarichi</i>	32
5.2	<i>Sedimenti e sabbie</i>	32
6	Sigle e abbreviazioni	34
7	BIBLIOGRAFIA	35

## SINTESI

Scopo prioritario dell'indagine, presentata nel seguito insieme ai risultati conseguiti, è stato quello di verificare un'eventuale tossicità legata alla natura dei solidi veicolati in mare tramite lo scarico industriale dello stabilimento Solvay Chimica Italia, ubicato nella frazione Rosignano Solvay del Comune di Rosignano Marittimo, in provincia di Livorno. La presenza di tossicità acuta è stata valutata mediante saggi ecotossicologici a breve termine.

I campioni sono stati prelevati in tre punti: a piè di impianto sodiera, nel punto di prelievo ufficiale Solvay e prima dell'immissione in mare (coacervo di tutti gli scarichi).

Su ciascun campione è stata separata la parte dei solidi sospesi e le analisi ecotossicologiche sono state eseguite separatamente sulle due frazioni utilizzando diversi organismi test.

Sono stati inoltre prelevati campioni di sedimento e sabbie e su questi sono stati effettuati saggi ecotossicologici sia sul tal quale che sull'elutriato al fine di valutare la presenza di composti tossici idrosolubili.

**I solidi sospesi di tutti gli scarichi** analizzati hanno evidenziato completa assenza di tossicità o tossicità inferiore al limite di "tossicità trascurabile". Anche gli altri saggi effettuati su fase solida, per i campioni di sedimenti e sabbie, sono risultati negativi.

Parole chiave:

**Solvay**

**Ecotossicologia**

## 1 INTRODUZIONE

Nel luglio 2003, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Ministero delle attività produttive, Regione Toscana, Provincia di Livorno, Comune di Rosignano, ARPAT e Società Solvay, hanno firmato un accordo di programma finalizzato alla difesa della costa, la tutela delle acque costiere e la tutela quali-quantitativa della risorsa idrica. Uno degli obiettivi dell'accordo richiedeva la progressiva riduzione della quantità di solidi sospesi scaricati in mare, costituiti per la maggior parte da carbonato di calcio anche con granulometria fine, per un quantitativo medio – al momento della firma dell'accordo - di circa 200.000 t/anno, con evidenti effetti di torbidità nel mare prospiciente. Gli scarichi contengono, tra gli altri componenti, varie impurezze derivanti dai cicli produttivi dello stabilimento oltre che dal calcare utilizzato come materia prima per la produzione di soda. Il Comitato di sorveglianza sull'attuazione dell'accordo, istituito presso il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, e la Regione Toscana, hanno richiesto la collaborazione di ARPAT per contribuire ad una "valutazione scientifica delle caratteristiche, in termini di utilità per il ripascimento, dell'apporto dei solidi sospesi scaricati in mare e delle caratteristiche di eventuale tossicità degli stessi, anche utilizzando (e confermando, ove possibile) i risultati degli studi già condotti in passato; tutto ciò in accordo anche con la Azienda USL e ferma restando la competenza di quest'ultima per gli aspetti connessi con la tutela della salute".

Vengono nel seguito illustrati i risultati del progetto di indagine, predisposto allo scopo di dare una risposta alle esigenze sopra descritte, e che ha previsto il ricorso a tecniche di indagine eco-tossicologiche sui materiali in sospensione presenti nello scarico e sui materiali solidi dallo stesso depositati nella zona di immissione in mare, oltre che sulle sabbie in aree contigue.

## 2 STRATEGIA DI CAMPIONAMENTO

La presente indagine ha come scopo prioritario la verifica di una eventuale tossicità legata alla natura dei solidi veicolati in mare tramite lo scarico industriale dello stabilimento Solvay Chimica Italia, ubicato nella frazione Rosignano Solvay del Comune di Rosignano Marittimo, in provincia di Livorno, a circa 25 km dal capoluogo.

Figura 2.1 – Ortofoto con individuazione dell'area dell'impianto



### 2.1 Descrizione degli scarichi

Lo stabilimento, in attesa della pubblicazione da parte del MATTM del provvedimento autorizzatori AIA di competenza ministeriale, è autorizzato allo scarico di acque reflue industriali con Atto Dirigenziale della Provincia di Livorno n. 50 del 19.07.2005, con scadenza 21.07.2008 (v. all. 19 di Marzo 2007).



L'autorizzazione prevede:

1- per lo scarico finale il rispetto dei valori limite di cui alla tabella 3 dell'allegato 5 del DLgs 152/1999 (attualmente abrogato e sostituito dal DLgs 152/2006), ad eccezione del parametro solidi totali sospesi, regolato da apposito accordo di programma ai sensi dell'art. 28 co.10 del DLgs 152/1999, e del parametro Escherichia Coli, per il quale è stabilito il limite di 5.000 UFC/100 ml. In particolare per quanto riguarda i solidi sospesi totali, l'accordo di programma sottoscritto in data 31.07.2003 prevedeva all'art. 7 che entro il 31.12.2007 i solidi veicolati negli scarichi fossero ridotti di almeno il 70% rispetto ai solidi prodotti all'atto dell'accordo procedimentale sottoscritto il 15.01.2000, cioè fossero ridotti di almeno 140.000 tonnellate,

2- per gli scarichi parziali a decorrere dal 01.11.2007 il rispetto per le sostanze di cui alla tabella 5 dell'allegato 5 del DLgs 152/1999 dei valori limiti stabiliti dalla tabella 3 dell'allegato 5 del DLgs 152/1999 (attualmente abrogato e sostituito dal DLgs 152/2006). Inoltre le unità produttive Clorometani ed Elettrolisi devono rispettare i limiti di cui alla tabella 3/A dell'allegato 5.

Nel Polo chimico di Rosignano Solvay, la Soc. Solvay Chimica Italia SpA ha in esercizio i seguenti impianti:

- Unità produttiva Sodiera;
- Unità produttiva Clorometani
- Unità produttiva Perossidati
- Unità produttiva Cloro-Soda

Lo stabilimento scarica i diversi reflui a mare, mediante il Canale "Fosso Bianco". La rete del sistema di scarico dello stabilimento è costituita da tre canali principali, in particolare:

- il fosso Nuovo, che confluisce nel fosso Lupaio,
- il fosso Lupaio, che confluisce nel fosso Bianco,
- il fosso Bianco, che scarica a mare.

Con AIA Provincia di Livorno A.D. 271 del 30/10/07 è stato individuato il piè di impianto dell'Unità produttiva Sodiera nel Fosso bianco a monte della confluenza con il fosso Lupaio.

Gli scarichi parziali delle Unità produttive Clorometani, Perossidati e Cloro-Soda confluiscono attraverso il fosso Nuovo e fosso Lupaio nel fosso bianco prima del punto di prelievo ufficiale ubicato sempre sul fosso Bianco.

Nella stessa area industriale sono presenti anche le attività connesse alla produzione di polietilene, di proprietà della Società INEOS Manufacturing Italia SpA, e pertanto le unità di produzione polietilene, il terminale di ricezione e il deposito di etilene e un impianto pilota. Operano inoltre l'impianto di cogenerazione della Rosen SpA e della ROSELECTRA SpA e i servizi generali per tutto lo stabilimento.

Lo stabilimento INEOS scarica i suoi reflui nel fosso Nuovo e quindi si vanno a sommare a quelli sopraccitati.

Gli impianti Rosen SpA e ROSELECTRA SpA hanno invece scarichi separati che confluiscono nel fosso Bianco dopo il punto di prelievo ufficiale della Solvay e prima dell'immissione in mare.

## **2.2 Punti di prelievo scarichi (analisi acque e solidi sospesi)**

Per distinguere i vari contributi dei singoli scarichi ed in considerazione che lo scarico derivante dall'Unità produttiva Sodiera è quello più consistente in termini quantitativi sia di

portata che di solidi contenuti rispetto allo scarico generale (i cui valori sono di seguito riportati), i campioni verranno prelevati nei seguenti punti:

- Piè di impianti sodiera
- Punto di prelievo ufficiale Solvay
- Prima dell'immissione in mare (coacervo di tutti gli scarichi)

Scarico generale Solvay Dati primo quadrimestre 2010	Concentrazione SOLIDI SOSPESI (g/L)	PORTATA F.Bianco e F.Lupaio	SOLIDI SOSPESI SCARICATI  t/giorno	SOLIDI SOSPESI SCARICATI (PROIEZIONE)  t/anno
	Dato Arpat	Dato S.I. m <sup>3</sup> /h		
<b>Medie aritmetiche</b>	<b>1,861</b>	<b>7322</b>	<b>324</b>	<b>118093</b>

Per ciascun punto è stato campionato un volume di 10 litri.

### 2.3 Punti di prelievo sedimenti e sabbie

Verranno prelevati campioni omogenei rappresentativi dei primi 40 cm di profondità. I campioni saranno prelevati nei seguenti punti:

- prima dell'immissione in mare
- spiaggia circa a 100m a nord dell'immissione in mare
- spiaggia circa a 100m a sud dell'immissione in mare

Per ciascun punto sono stati campionati circa 2kg di sabbie.

### 2.4 Frequenza di campionamento

Tutti i punti saranno campionati 6 volte ad intervalli di circa 2 settimane in uno spazio temporale di 3 mesi.

### 2.5 Tests eseguiti su le diverse matrici

Su ciascun campione di scarico verrà separata la parte dei solidi sospesi e le analisi ecotossicologiche saranno effettuate separatamente sulle due frazioni secondo lo schema riportato nella seguente tabella:

<b>Parametro</b>	<b>Matrice: scarico</b>
<i>Artemia sp.</i>	Acqua di scarico privata del sedimento
<i>Brachionus plicatilis</i>	Acqua di scarico privata del sedimento
Batteri bioluminescenti (fase liquida)	Acqua di scarico privata del sedimento
Batteri bioluminescenti (fase solida)	Solidi sospesi recuperati dall' acqua di scarico

Sui campioni di sedimento o sabbia sarà effettuato un test sul campione tal quale e tests sull'elutriato al fine di valutare la presenza di tossici idrosolubili secondo lo schema riportato nella seguente tabella:

<b>Parametro</b>	<b>Matrice: sedimento o sabbia</b>
<i>Artemia sp.</i>	Test eseguito su elutriato
<i>Brachionus plicatilis</i>	Test eseguito su elutriato
Batteri bioluminescenti (fase liquida)	Test eseguito su elutriato
Batteri bioluminescenti (fase solida)	Test eseguito su sedimento tal quale

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 Tests di tossicità acuta con batteri bioluminescenti (*Vibrio fischeri*) su matrice solida: Metodo SPT (Solid Fase Test) e correzione pelitica – Metodo ICAM - Appendice 2 Metodi Analitici di Riferimento – 2001

Il metodo 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. Il metodo consente la verifica della tossicità di campioni, esprimendo i risultati come inibizione percentuale (I%), come concentrazione efficace ad indurre un'inibizione della bioluminescenza pari al 50% (EC<sub>50</sub>), o come STI (Sediment Toxicity Index).

##### 3.1.1 Riattivazione della sospensione batterica

Le sospensioni congelate dei batteri, nel nostro caso acquistate, sono state riattivate prima dell'uso aggiungendo 1 mL di soluzione ricostituente, precedentemente termostata per 15 minuti nell'apposito alloggiamento del luminometro m500. Dopo aver agitato per circa 30 secondi, la sospensione batterica è stata versata rapidamente e senza l'ausilio di pipette nella cuvetta che è stata nuovamente posta nel pozzetto a termostatare per almeno 30 min.

##### 3.1.2 Conduzione del saggio

Il campione è stato centrifugato per 30 min. a 3000 rpm alla temperatura di 10°C. Dopo aver eliminato il sovrantante, 7 gr. sono stati agitati mediante agitatore magnetico con 35mL di diluente. Dopo 10 minuti, con il campione sempre in agitazione, sono state allestite diluizioni seriali 1:2 in provette SPT ed incubate a 15°C per 10 minuti. 20µL di sospensione batterica è stata, quindi, aggiunta in tutte le provette SPT allestite. Dopo un'ulteriore incubazione di 20 minuti a 15°C il contenuto di ogni provetta è stato filtrato con gli appositi filtri precedentemente inseriti nelle provette. 500µL di filtrato è stato quindi trasferito nella cuvetta corrispondente già presente nello strumento m500. Le letture sono state eseguite dopo ulteriori 10 minuti di incubazione.

In presenza di campione positivo, è stata eseguita la correzione del colore.

##### 3.1.3 Correzione del colore

La correzione del colore è stata eseguita mediante lettura spettrofotometrica nel visibile (490nm) di tutte le diluizioni del campione, previa filtrazione con filtri SPT. I dati ottenuti sono stati inseriti, tramite software, nella apposita colonna alla diluizione corrispondente in modo che il programma effettui le correzioni.

Nel caso di confermata positività del campione, è stata eseguita la correzione pelitica.

##### Correzione pelitica

Ogni sedimento ha una tossicità naturale che è associata alla percentuale di pelite (frazione <63µm). Per eseguire la normalizzazione della tossicità osservata è necessario quindi valutare la % di pelite.

La tossicità naturale stimata si calcola con la seguente funzione:

$$UT_{\text{naturale stimata}} = 0,28 + 3,49(\% \text{ pelite})$$

A questo punto il livello di tossicità acuta del sedimento è esprimibile come STI (Sediment Toxicity Index) espresso dalla seguente formula:

$$STI = UT_{\text{osservate}} / UT_{\text{naturale stimata}}$$

### **3.2 Test di tossicità acuta con batteri bioluminescenti (*Vibrio fischeri*) su matrice liquida - Metodo: APAT IRSA CNR 8030 Manuale 29/03: 2003**

Anche in questo caso il metodo 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.

#### **3.2.1 Riattivazione della sospensione batterica**

La riattivazione della sospensione batterica è stata eseguita come descritto al punto 3.1.1.

#### **3.2.2 Conduzione del saggio**

Una cuvetta è stata introdotta nel pozzetto F5 (Fig.3.1 a) ed in essa sono stati inseriti 900µL di diluente. Dopo 5 minuti la sospensione batterica è stata risospesa con l'aiuto di una micropipetta (7-10 volte) e quindi sono stati prelevati 100µL e inseriti nella cuvetta in F5. Dopo 15 minuti è stata eseguita l'analisi immettendo le cuvette nei pozzetti del luminometro in quantità sufficiente per eseguire 5 diluizioni del campione nei pozzetti: C1, A5, A4, A3, A2, A1 (Figura 2.1).

Nelle file lasciate, in corrispondenza delle cuvette, ne sono state inserite delle altre vuote ovvero in B1, B2, B3, B4, B5, D1. Quindi nella cuvetta C1 sono stati introdotti 2.5mL del campione. Per salinità del campione inferiore al 2% sono stati aggiunti 250µL di OAS. Nelle altre cuvette sono stati introdotti 1.5 mL di diluente. Il campione è stato diluito nel modo seguente: partendo da C1 sono stati prelevati 1,5 mL e trasferiti in A5. Da qui sono stati prelevati 1,5mL ed introdotti in A4 e così via seguendo la sequenza schematizzata in Fig. 3.1a. Il pozzetto A1 era il controllo negativo.

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	<b>1,5mL diluente</b>	<b>1,5mL diluente</b> 1,5mL←da A3	<b>1,5mL diluente</b> 1,5mL←da A4	<b>1,5mL diluente</b> 1,5mL←da A5	<b>1,5mL diluente</b> 1,5mL←da C1
<b>B</b>					
<b>C</b>	<b>2,5mL campione</b> (+ 250µL OAS se acqua dolce)				
<b>D</b>					

**Fig. 3.1 a Schematizzazione diluizioni campione**

Terminati i 15 minuti la sospensione batterica è stata risospesa in F5 e 100µL sono stati introdotti nei pozzetti lasciati vuoti ovvero in B1, B2, B3, B4, B5, D1. B1 è stato quindi introdotto nel pozzetto di lettura “read” ed è stata effettuata la lettura ( $I_0$ ) delle cuvette seguendo lo schema previsto dal PC.

Terminata la lettura dell’ $I_0$  di tutte le cuvette, sono stati prelevati 900µL dalla cuvetta in A1 e trasferiti nella cuvetta in B1; la stessa sequenza è stata ripetuta per le cuvette in A2, A3, A4, A5 e C1, così come schematizzato in *Figura 3.1. b*

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	<b>900µL</b>	<b>900µL</b>	<b>900µL</b>	<b>900µL</b>	<b>900µL</b>
<b>B</b>	100µL ↓	100µL ↓	100µL ↓	100µL ↓	100µL ↓
<b>C</b>	<b>900µL</b>				
<b>D</b>	100µL ↓				

**Fig. 3.1 b Schematizzazione diluizioni campione**

### 3.2.3 Espressione del risultato

Il risultato può essere espresso come: valore peggiore di  $EC_{50}$  nei tre tempi di esposizione oppure come valore peggiore di  $EC_{20}$  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 sottoelencate regole:

- Il risultato si esprime come  $EC_{50}$
- Nel caso in cui la  $EC_{50}$  di un campione sia superiore al 100%, il risultato viene espresso anche come  $EC_{20}$ , se calcolabile.
- Quando la percentuale di inibizione è superiore o uguale al 20% ma non è calcolabile l’ $EC_{20}$ , 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 campione è considerato privo di tossicità.

### **3.3 Test di tossicità acuta con rotiferi (*Brachionus plicatilis*) su matrice liquida - Metodo: Metodo interno MI/B/05/004 secondo SOP del Rotoxkit M della ditta MicroBioTests Inc.**

Il saggio si basa sulla valutazione della mortalità del rotifero *B. 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.

Prima di condurre il saggio è stata preparata l'acqua di mare standard aggiungendo ad 800 mL di acqua deionizzata fiale contenenti soluzioni di sali concentrati (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) fornite nel Kit. Lo standard di acqua di mare è stato portato al volume finale di un litro aggiungendo altra acqua deionizzata e conservato al buio in cella frigorifera a +4°C±2°C, fino al momento dell'utilizzo sia come diluente del campione da analizzare che, opportunamente diluito, come terreno per la schiusa delle cisti.

#### **3.3.1 Riattivazione delle cisti**

La schiusa delle cisti di *B. plicatilis* è stata allestita 28-30 ore prima dell'inizio del test utilizzando acqua di mare a salinità ridotta (25 ppm) preparata mescolando 5,7 mL di acqua di mare standard con 4,3 mL di acqua deionizzata. Il contenuto di una fiala di cisti di *B. plicatilis* è stato svuotato nel pozzetto di schiusa della piastra multipozzetto dove è stato eseguito il test. Tale operazione è stata eseguita avendo cura di risciacquare la fiala per raccogliere le eventuali cisti rimaste all'interno e verificando che la maggior parte delle cisti fosse sommersa dopo aggiunta di 2 mL di acqua di marea a salinità ridotta. La piastra è stata, quindi, coperta con parafilm ed incubata a 25°C±1°C per 28 ore con illuminazione continua (fonte luminosa di 3000-4000 Lux).

#### **3.3.2 Conduzione del saggio**

Il test è basato su un controllo e su 5 diluizioni del campione, ognuna con 6 repliche di 5 organismi ed è considerato valido se la mortalità del controllo non supera il 10%.

Il saggio è stato effettuato in una speciale piastra multipozzetto in PVC che contiene oltre un pozzetto di schiusa, 6 pozzetti di risciacquo e 36 pozzetti test, ordinati orizzontalmente in colonne da A ad F e in righe da X (controllo) e da 1 a 5 (per le varie diluizioni). La distribuzione delle soluzioni test è iniziata dal controllo negativo (riga X, in alto) fino alla concentrazione più alta (riga 5, in basso). Sono stati aggiunti 0,7 mL di acqua standard nel pozzetto di risciacquo e 0,3 mL nei pozzetti test per il controllo negativo, le stesse quantità delle varie diluizioni nei rispettivi pozzetti numerati. Con l'aiuto di uno stereomicroscopio sono stati trasferiti circa 50 rotiferi dal pozzetto di schiusa a quello di risciacquo del controllo e ripetendo l'operazione nelle file dalla 1 alla 5. Dopo circa un'ora, per permettere ai rotiferi di adattarsi al cambiamento di salinità, sono stati trasferiti in sequenza, 5 rotiferi dal pozzetto di risciacquo in ognuno dei 6 pozzetti test, ripetendo l'operazione per le file dalla 1 alla 5. La

piastra è stata, quindi, nuovamente coperta con il Parafilm e con il coperchio in plastica ed incubata a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  al buio.

Dopo 24 ore è stato effettuato il conteggio dei rotiferi morti in ogni pozzetto (considerando come morti gli organismi immobili in 5 secondi di osservazione). E' stata, infine, calcolata la percentuale di mortalità.

### **3.3.3 Espressione del risultato**

Il risultato è stato espresso come: percentuale di mortalità.

## **3.4 Test di tossicità acuta con Artemia (*Artemia sp.*) su matrice liquida - Metodo: APAT IRSA CNR 8060 Manuale 29/03: 2003**

Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di campioni acquosi o di estratti provenienti o afferenti a corpi idrici marini o salmastri utilizzando come risposta l'immobilizzazione del crostaceo marino *Artemia sp.*

### **3.4.1 Riattivazione delle cisti**

La riattivazione delle cisti deve avvenire circa 48 ore prima del saggio. A tal fine in una piastra Petri (5 cm di diametro) sono stati aggiunti 12 mL di soluzione salina con una quantità di cisti pari a 100 mg . La piastra è stata esposta per almeno un'ora a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e a 3000-4000 lux di intensità luminosa. Successivamente le cisti sono state incubate al buio alla stessa temperatura, per 24 ore. Il giorno successivo le larve schiuse sono state trasferite in una nuova piastra di Petri riempita con 12 mL di soluzione salina e mantenuta per altre 24 ore alla stessa temperatura.

### **3.4.2 Conduzione del saggio**

Varie procedure di conduzione possono essere adottate a seconda che sia noto (saggio definitivo) o no (saggio preliminare) l'ambito di concentrazioni entro cui ci si aspetta di rilevare l'effetto tossico dell'acqua di scarico o degli estratti da analizzare. Per campioni poco tossici o per corpi idrici superficiali si consiglia di adottare la procedura di saggio a 96 ore, mentre per le acque di scarico quella a 24 ore.

### **3.4.3 Saggio preliminare**

Quando sia ignota la tossicità del campione da analizzare occorre procedere saggiando un ampio intervallo di diluizioni. Si consiglia di saggiare, oltre alla soluzione controllo, il campione tal quale e almeno cinque diluizioni successive 1:10 con la soluzione diluente, pari al 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% del campione.

Per ogni singolo test sono state utilizzate piastre a 24 posti (6 righe per 4 colonne). Nella prima riga è stato aggiunto 1 mL della soluzione di controllo, nelle successive righe il campione e le relative diluizioni. Sono stati trasferiti quindi nella prima colonna, con una pipetta in plastica, una cinquantina di Artemie allo stadio larvale II e III prelevate dalla piastra Petri. Sono stati trasferiti quindi nelle colonne 2-3-4 i naupli in numero di 10 per ciascun



pozzetto e per un totale di 30 individui per ciascuna diluizione, avendo cura di lavare in acqua deionizzata la pipetta prima di passare da una riga a quella successiva. La piastra è stata chiusa con uno strato di parafilm e con il relativo coperchio ed incubata alla temperatura di  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 24 ore al buio.

Il giorno successivo la piastra è stata collocata al binocolare al fine di contare gli organismi vivi sul numero totale degli organismi iniziali. Le larve si considerano morte quando rimangono immobili per almeno 10 secondi continui di osservazione. Se la mortalità della soluzione di controllo è superiore al 10% il saggio non è valido.

Al termine della prova preliminare è generalmente possibile individuare un ambito di concentrazioni entro cui procedere per il successivo saggio definitivo. Di norma tale intervallo è compreso tra la concentrazione che causa la completa inibizione della motilità del crostaceo e quella che non inibisce tale attività.

#### **3.4.4 Saggio definitivo a 96 ore**

Per campioni poco tossici (cioè con percentuale di inibizione della motilità inferiore al 50%) è necessario prolungare la durata del saggio a 96 ore.

Dopo la riattivazione delle cisti, 10 naupli allo stadio larvale II-III sono stati trasferiti in beaker da 50 mL riempiti con 40 mL di soluzione test. Nel nostro caso i campioni sono stati saggiati tal quali in tre repliche. Nel saggio è stata utilizzata anche la soluzione di controllo. I beaker sono stati chiusi con parafilm e tenuti a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  con un ciclo di illuminazione di 14:10 luce:buio. I naupli sono stati alimentati durante il saggio. Ogni 24 ore dall'inizio del saggio è stato registrato il numero di individui vivi sul totale di quelli posti in esperimento.

#### **3.4.5 Espressione del risultato**

Il risultato può essere espresso come percentuale di mortalità.

### **3.5 Trattamento del campione**

#### **3.5.1 Campioni liquidi (scarichi)**

Appena arrivati in laboratorio è stato subito misurato il pH e la salinità dei campioni.

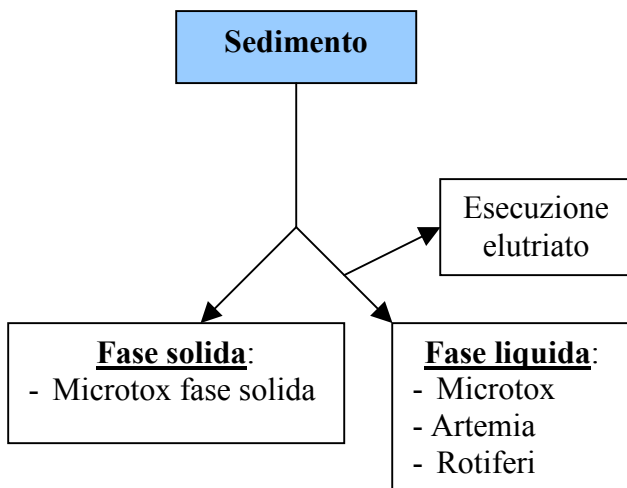
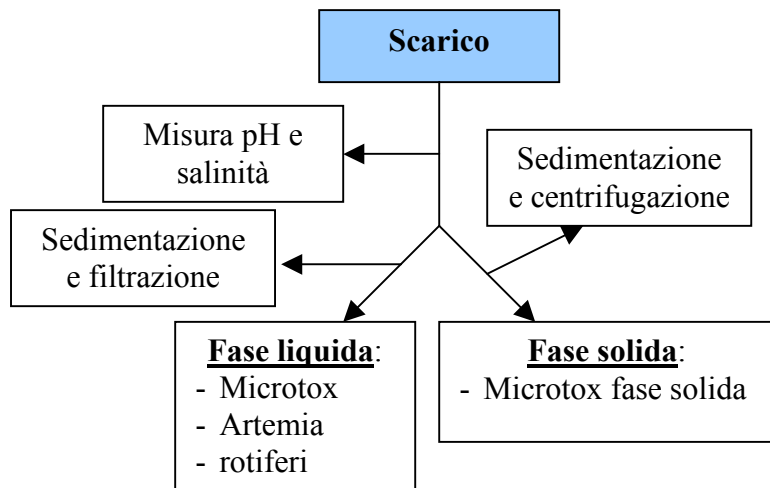
Dopo 24 ore, con l'aiuto di una pipetta, è stato recuperato il sedimento che nel frattempo è precipitato sul fondo. La sospensione che si ottiene è stata centrifugata a 3000 rpm per 10 minuti per separare la parte solida da quella liquida. Eliminato il sovrantante, il sedimento è pronto per il test microtox in fase solida (vedi fig. 3.2). Sullo scarico tal quale dopo sedimentazione e filtrazione, sono stati allestiti il test microtox (fase liquida) ed i saggi con Artemia e Rotiferi.

#### **3.5.2 Campioni solidi (sedimenti e sabbie)**

Sul sedimento tal quale è stato eseguito il test microtox in fase solida (vedi fig. 3.1), mentre sull'elutriato sono stati effettuati il test microtox (fase liquida) ed i saggi con Artemia e Rotiferi.

L'elutriato è stato ottenuto agitando il sedimento con acqua marina standard (1/4 peso/volume) per 60 minuti e centrifugando poi la sospensione a 3000rpm per 10 minuti. L'elutriato è il sovrantante ottenuto dalla centrifugazione (vedi fig. 3.2).

Figura 3.2 – Schema del trattamento dei campioni e analisi per singola matrice



### 3.6 Classe di tossicità

#### 3.6.1. Criteri per la classificazione dei sedimenti

Di seguito si riporta la tabella 3.1 ai fini della classe di tossicità dei sedimenti (estratto modificato dal documento APAT ICRAM (2007) – “Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini”). Gli stessi criteri sono stati utilizzati per classificare i campioni di sedimento analizzati, e per analogia sono stati adottati per classificare i solidi presenti negli scarichi.

Tabella 3.1 – Classe di tossicità dei sedimenti marini in funzione della specie utilizzata nel saggio ecotossicologico

SPECIE	CLASSE A Tossicità assente o trascurabile	CLASSE B Tossicità media	CLASSE C Tossicità alta	CLASSE D Tossicità molto alta
<i>Vibrio fischeri</i> (elutriato)	EC <sub>20</sub> ≥ 90% %inibizione <20	EC <sub>20</sub> < 90% e EC <sub>50</sub> ≥ 90% 20 < %inibizione ≤ 40	20% ≤ EC <sub>50</sub> < 90% 40 < %inibizione ≤ 80	EC <sub>50</sub> < 20% %inibizione > 80
<i>Vibrio fischeri</i> (sedimento)	STI ≤ 3	3 < STI ≤ 6	6 < STI ≤ 12	STI > 12
<i>Brachionus plicatilis</i>	EC <sub>20</sub> ≥ 90% Mortalità < 20	EC <sub>20</sub> < 90% e EC <sub>50</sub> > 100%	40% ≤ EC <sub>50</sub> < 100%	EC <sub>50</sub> < 40%
<i>Artemia franciscana</i>	EC <sub>20</sub> ≥ 90% Mortalità < 20	EC <sub>20</sub> < 90% e EC <sub>50</sub> > 100%	40% ≤ EC <sub>50</sub> < 100%	EC <sub>50</sub> < 40%

#### 3.6.2. Criteri per la classificazione dei reflui

La normativa vigente prevede per il controllo delle acque reflue industriali che il saggio di tossicità acuta sia obbligatorio (nota 5 della tab 3 dell'allegato 5 del d.lgs 152/06).

Il test con *D. magna* è considerato il test di elezione per valutare la tossicità delle acque reflue industriali, infatti i valori limite, del parametro della tabella 3 definito saggio di tossicità acuta, diversi a seconda che lo scarico si immetta in acque superficiali o in pubblica fognatura, sono definiti con evidente riferimento alla prova di tossicità acuta eseguita con questo crostaceo. Per gli scarichi in acque superficiali, il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero di organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale. *D. magna* è un organismo di acqua dolce e risulta, quindi, sensibile alla salinità. Numerosi lavori (Arner e Koivisto, 1993; Schuytema et al., 1997) hanno indagato gli effetti della salinità su questi cladoceri. Da queste indagini risulta che *Daphnia* cresce e si riproduce senza problemi in acque con salinità fino al 4‰. Per valutare la tossicità, un documento EPA (EPA, 1991) consiglia di usare organismi d'acqua dolce per quei campioni che presentano una salinità inferiore all'1‰. Testi di tossicità acuta eseguiti nel nostro laboratorio con soluzioni a

salinità crescente, hanno confermato che la massima salinità tollerata nel test di tossicità acuta è del 6‰ affinché non si verifichi nessun effetto. L'elevata salinità degli effluenti di alcuni scarichi, di norma superiore al 6‰, può interferire nel test di tossicità effettuato con *D. magna*. La tossicità di campioni acquosi o di estratti acquosi di campioni solidi viene calcolata dalle curve concentrazione-effetto utilizzando la regressione lineare e viene espressa come LC50 (concentrazione che induce l'effetto letale nel 50% della popolazione) o come EC50 (concentrazione che produce il 50% dell'effetto). La tossicità è espressa come concentrazione del campione in percentuale. Es LC50=25% significa che il campione di scarico se diluito 4 volte (25% utilizzato nel test) immobilizza il 50% degli organismi.

I valori di L(E)C50 vengono convertiti in unità tossiche (TU) per ottenere una espressione di tossicità dove ad TU più elevate corrisponde una tossicità più elevata e non vice versa (come nel caso di LC50 ed EC50). La conversione è ottenuta con la seguente formula:

$$TU=100\%/L(E)C50$$

Ritornando alla normativa il valore limite, del quale non è indicata l'unità di misura, tradotto in termini numerici e nelle unità di misura correntemente utilizzate in tossicologia ambientale e come sopra riportato, corrisponde al seguente valore: EC50<sub>24h</sub> =100% (Unità tossiche 1). EC50<sub>24h</sub> è la concentrazione efficace dello scarico capace di provocare l'effetto tossico nel 50% della popolazione esposta nel periodo di 24 ore. Tuttavia, essendo *D. magna* un organismo di acqua dolce, sensibile quindi alla salinità, come riportato precedentemente è stato necessario utilizzare organismi idonei per scarichi di acqua salata, quali batteri bioluminescenti (*V. fischeri*, batterio marino), *Artemia franciscana* e *Brachionus Plicatilis*. Non essendo riportato nella tabella 3 il limite per saggi diversi da *D. magna* si è ritenuto riportare il risultato ad Unità Tossiche per rendere possibile un confronto rispetto al valore limite della normativa stessa.

Per il tests con *D. magna* il limite è superato quando il valore risulta essere uguale o maggiore di una UT, analogamente potrà essere fatto lo stesso ragionamento per gli altri test una volta che il risultato sia stato riportato in UT.

Secondo la normativa vigente in caso di esecuzione di più test di tossicità deve essere considerato il risultato peggiore (nota 5 della tab 3 dell'allegato 5 del D.Lgs 152/06)

Questo tipo di impostazione è quello proposto nel lavoro di Persoone et al (2003) per la classificazione dei reflui in 5 classi sulla base di una scala crescente di tossicità del campione attribuita utilizzando come riferimento il valore più elevato di UT evidenziate in uno dei saggi utilizzati nella batteria. Inoltre, questa classificazione consente di attribuire il peso percentuale del grado di tossicità all'interno della classe. Di seguito si descrivono le 5 classi di qualità:

**Classe I: campione privo di tossicità acuta**-nessuno dei test evidenzia effetto tossico

**Classe II campione debolmente tossico**-la percentuale di effetto evidenziata in almeno un test è significativamente più alta del controllo, ma rimane al di sotto del 50%(< 1UT). Il 20% di effetto è considerata la minima % in grado di indurre un impatto tossico significativo. Il 20% corrisponde a 0.4 UT (dal momento che il 50% di effetto =1UT, 20%=0.4 UT, il 30%=0.6 ed il 40%=0.8)

**Classe III campione tossico**-si evidenzia un effetto ≥ 50% in almeno un test, ma nel campione diluito 10 volte l'effetto è < 50% (=1-10 UT)

**Classe IV-campione molto tossico** -si evidenzia un effetto del 50% anche nel campione diluito 10 volte in almeno un test, ma non se diluito 100 volte (=10-100 UT)

**Classe V campione estremamente tossico**- si evidenzia un effetto del 50% nel campione diluito 100 volte per almeno un test ( $\geq 100$  UT)

Tabella 3.2 – Classe di tossicità dei reflui

Classe	UT	Tossicità
I	$<0,4$	Non tossico
II	$0,4 \leq UT < 1$	Debolmente tossico
III	$1 \leq UT < 10$	Tossico
IV	$10 \leq UT < 100$	Molto tossico
V	$\geq 100$	Estremamente tossico

### 3.6.2.1 Calcolo del peso percentuale della tossicità all'interno di una classe

I criteri per attribuire il punteggio a ciascun test sono i seguenti:

- effetto tossico non significativo= score 0
- effetto tossico significativo, ma  $UT < 1$ = score 1
- 1-10 UT= score 2
- 10-100 UT= score 3
- >100 UT= score 4

Il calcolo del punteggio della classe è effettuato sommando i test score ottenuti dai saggi effettuati e dividendo per il numero dei saggi eseguiti, infine il peso % della tossicità all'interno della classe= (punteggio della classe)/(il punteggio massimo raggiunto )x100

## 4 RISULTATI

### 4.1 Risultati scarichi (analisi acque)

Di seguito (tabelle 4.1, 4.2, 4.3) sono riportati in dettaglio i risultati dei campioni prelevati nei tre punti degli scarichi ottenuti sulla matrice acquosa privata della componente solida.

I campioni sono stati classificati sulla base del saggio che ha evidenziato le UT maggiori seguendo i criteri riportati nel paragrafo 3.6.2.; è stato inoltre calcolato il peso % della tossicità all'interno della classe secondo quanto riportato al punto 3.6.2.1.

Tabella 4.1 – Risultati scarico sodiera fosso Bianco

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto)	26,95% 0,4 ≤ UT < 1	39,75% 0,4 ≤ UT < 1	41,49% 0,4 ≤ UT < 1	41,03% 0,4 ≤ UT < 1	20,57% 0,4 ≤ UT < 1	<20% UT < 0,4
Tossicità acuta con <i>Artemia</i> sp. % effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	0
Tossicità acuta con rotiferi ( <i>B. plicatilis</i> ) .% effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	0
Classe	II	II	II	II	II	I
Tossicità	Debolmente tossico	Debolmente tossico	Debolmente tossico	Debolmente tossico	Debolmente tossico	Assenza di tossicità
Peso % della tossicità All'interno della classe di appartenenza	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	-
Salinità	>50‰	>50‰	>50‰	>50‰	>50‰	>50‰
pH	9,25	8,95	9,10	9,28	8,65	9,17

Come si osserva nella tabella 4.1, 5 campioni su 6 prelevati allo scarico sodiera sono risultati debolmente tossici con un peso % di tossicità all'interno della II classe piuttosto basso (33,3%).

Allo scarico generale (tabella 4.2) 4 campioni su 6 hanno ottenuto la stessa classificazione e lo stesso peso %, mentre soltanto 1 campione su 6 è risultato appartenere alla classe III, ma con un peso % basso 33,3%. Infine, per quanto riguarda lo scarico finale (tabella 4.3) 4 campioni su 6 sono risultati privi di tossicità, mentre 2 su 6 sono risultati debolmente tossici con un peso % basso del 33,3%. In sostanza, soltanto un campione prelevato allo scarico generale è risultato tossico, ma con % di effetto molto vicina al limite inferiore della classe e

con un peso % di tossicità all'interno della classe basso. Infatti, soltanto un saggio su tre è risultato positivo.

Tabella 4.2 – Risultati scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lumaio acque

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto)	49,23%	27,79%	53,42%	38,67%	<20%	39,63%
	0,4 ≤ UT < 1	0,4 ≤ UT < 1	1 ≤ UT < 10	0,4 ≤ UT < 1	UT < 0,4	0,4 ≤ UT < 1
Tossicità acuta con <i>Artemia sp.</i> % effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	0
Tossicità acuta con rotiferi ( <i>B. plicatilis</i> ) .% effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	0
Classe	II	II	III	II	I	II
Tossicità	Debolmente tossico	Debolmente tossico	Tossico	Debolmente tossico	Assenza di tossicità	Debolmente tossico
Peso % della tossicità All'interno della classe di appartenenza	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%		33,3%
Salinità	>50‰	>50‰	>50‰	>50‰	>50‰	>50‰
pH	9,34	8,64	9,25	9,32	7,83	8,97

Tabella 4.3 – Risultati scarico finale a mare

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto)	<20%	<20%	30,21%	33,45%	<20%	<20%
	UT < 0,4	UT < 0,4	0,4 ≤ UT < 1	0,4 ≤ UT < 1	UT < 0,4	UT < 0,4
Tossicità acuta con <i>Artemia sp.</i> % effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	0
Tossicità acuta con rotiferi ( <i>B. plicatilis</i> ) .% effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	0
Classe	I	I	II	II	I	I
Tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Debolmente tossico	Debolmente tossico	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità
Peso % della tossicità All'interno della classe di appartenenza			33,3%	3,3%		
Salinità	>50‰	>50‰	>50‰	>50‰	45.6‰	>50‰
pH	8,50	8,36	9,23	8,91	8,20	9,11

Dal momento che le acque reflue sono caratterizzate da pH elevato e elevata salinità, sui campioni che hanno evidenziato una percentuale di effetto >20% con i batteri bioluminescenti, l'analisi è stata ripetuta eseguendo sul campione la correzione sia del pH che della salinità, portandoli rispettivamente a pH 7,20 e salinità 35‰. I risultati, riportati nella tabelle 4.1b, 4.2b e 4.3b, hanno dimostrato assenza di tossicità in tutti i campioni analizzati, indicando che molto verosimilmente le tracce di tossicità riscontrata risiedono in questi due fattori.

Tabella 4.1 B – Risultati scarico sodiera fosso Bianco-test *V. fischeri* con pH e salinità corretti.

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto)	<20% UT<0,4	<20% UT<0,4	<20% UT<0,4	<20% UT<0,4	<20% UT<0,4	
Tossicità acuta con <i>Artemia sp.</i> % effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	
Tossicità acuta con rotiferi ( <i>B. plicatilis</i> ) .% effetto (mortalità)	0	0	0	0	0	
Classe	II	II	II	II	II	
Tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	
Salinità	35‰	35‰	35‰	35‰	35‰	
pH	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20	



Tabella 4.1 B– Risultati scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lumaio acque test *V. fischeri* con pH e salinità corretti.

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto)	<20% UT<0.4	<20% UT<0.4	<20% UT<0.4	<20% UT<0.4		<20% UT<0.4
Classe	I	I	I	I		I
Tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità	Assenza di tossicità		Assenza di tossicità
Salinità	35‰	35‰	35‰	35‰		35‰
pH	7,20	7,20	7,20	7,20		7,20

Tabella 4.3 B – Risultati scarico finale a mare test *V. fischeri* con pH e salinità corretti.

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto)			<20% UT<0,4	<20% UT<0,4		
Classe			II	II		
Tossicità			Assenza di tossicità	Assenza di tossicità		
Salinità			35‰	35‰		
pH			7,20	7,20		

## 4.2 Risultati scarichi-solidi sospesi

**I solidi sospesi di tutti i campioni di scarichi** analizzati hanno evidenziato assenza di tossicità (STI<1) in 5 campioni su 6. I campioni prelevati il 20.06.11 hanno evidenziato una valore di STI >1, ma comunque sempre <3 (valore massimo repertato 1,68 allo scarico generale), che è il valore riferito a tossicità trascurabile (APAT-ICRAM, 2007).

Tabella 4.2 – Risultati sodiera fosso bianco

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti – fase solida (STI)	<1	1,0897	<1	<1	<1	<1
Classe	A	A	A	A	A	A
Tossicità	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile

Tabella 4.3 – Risultati scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lumaio sedimenti

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti – fase solida (STI)	<1	1,6802	<1	<1	<1	<1
Classe	A	A	A	A	A	A
Tossicità	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile

Tabella 4.4 – Risultati scarico finale a mare

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti – fase solida (STI)	<1	1,1439	<1	<1	<1	<1
Classe	A	A	A	A	A	A
Tossicità	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile	assente o trascurabile

#### 4.3 Risultati sedimenti e sabbie (analisi sedimenti ed elutriati)

Di seguito (tabelle 4.4, 4.5, 4.6) sono elencati in dettaglio i risultati dei tre punti di campionamento.

I valori di EC<sub>20</sub> e EC<sub>50</sub> del parametro “Tossicità acuta con batteri bioluminescenti”, sono stati calcolati per estrapolazione in quanto l'effetto tossico è rilevato solo alle concentrazioni più elevate.

**I saggi effettuati sugli elutriati** con *Artemia* sp e *Brachionus* sp sono risultati negativi in tutti i campioni analizzati, mentre quelli effettuati con *V. fischeri* hanno evidenziato tossicità media in 2 campioni su 6 nei campioni 100 m a nord e in 1 su 6 nei campioni 100 m a sud, utilizzando i criteri riportati nel paragrafo 3.6.1. Va, inoltre, sottolineato che il saggio risulta negativo quando il pH > 8.5 dei tre campioni tossici viene neutralizzato in laboratorio.

**Il saggio su fase solida** con batteri bioluminescenti ha dato esito negativo in tutti i campioni analizzati (STI<1)

Tabella 4.4 – Risultati sedimenti prelevati in prossimità confluenza fosso a mare

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto) (su elutriato)	32,17%	21,06% (EC <sub>20</sub> = 87,55%) (EC <sub>50</sub> = 156,60%)	36,15% (EC <sub>20</sub> = 70,62%) (EC <sub>50</sub> = 104,60%)	< 20%	< 20%	< 20%
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto) (su elutriato con pH corretto a 7,2)	< 20%	< 20%	< 20%	Non eseguito	Non eseguito	Non eseguito
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti – fase solida (STI)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Tossicità acuta con <i>Artemia sp.</i> (su elutriato)	0	0	0	0	0	0
Tossicità acuta con rotiferi ( <i>B. plicatilis</i> ) (su elutriato)	0	0	0	0	0	0
pH elutriato	8,76	8,55	8,81	8,35	8,06	8,28
	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Classe-tossicità	Classe B Tossicità media	Classe B Tossicità media	Classe B Tossicità media	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente
(pH elutriato corretto a 7,2)	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente			

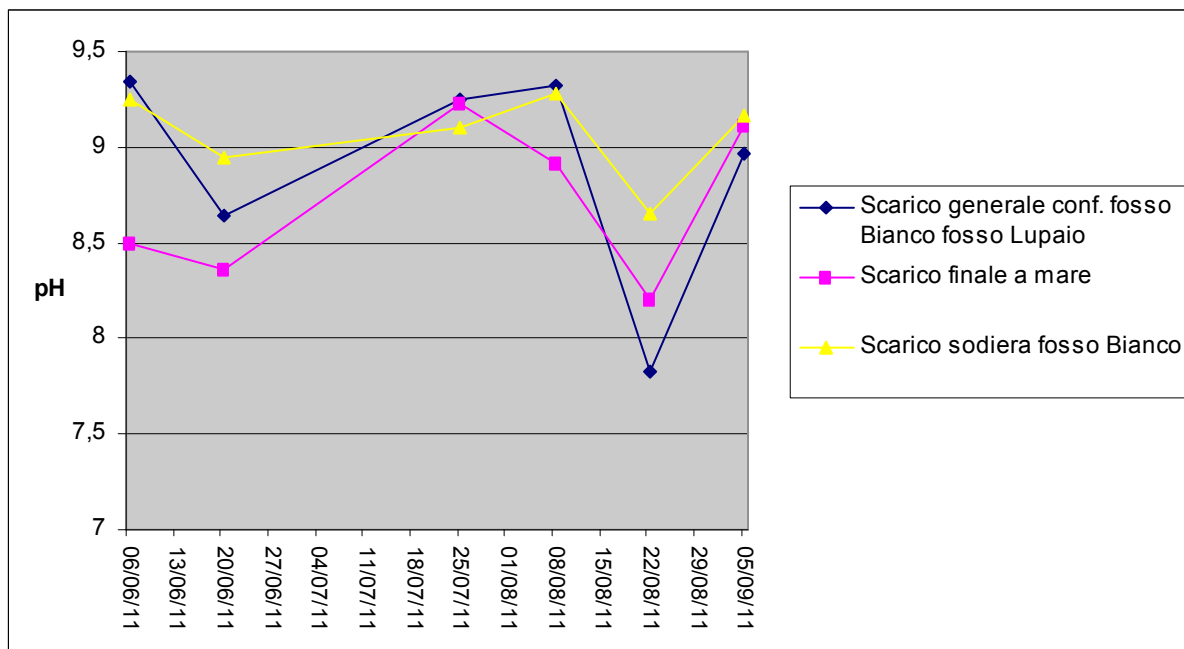
Tabella 4.5 – Risultati sedimenti prelevati 100m a nord scarico a mare

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto) (su elutriato)	21,21%	23,00% (EC <sub>20</sub> = 75,60%) (EC <sub>50</sub> = 222,00%)	< 20%	< 20%	< 20%	< 20%
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto) (su elutriato con pH corretto a 7,2)	< 20%	< 20%	Non eseguito	Non eseguito	Non eseguito	Non eseguito
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti – fase solida (STI)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Tossicità acuta con <i>Artemia sp.</i> (su elutriato) % mortalità	0	0	0	0	0	0
Tossicità acuta con rotiferi ( <i>B. plicatilis</i> ) (su elutriato)%mortalità	0	0	0	0	0	0
pH elutriato	8,71	8,62	8,43	8,42	8,18	7,83
	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Classe-tossicità	Classe B Tossicità media	Classe B Tossicità media	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente
Classe-tossicità (pH elutriato corretto a 7,2)	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente				

Tabella 4.6 – Risultati sedimenti prelevati 100m a sud scarico a mare

	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto) (su elutriato)	< 20%	< 20%	< 20%	23,60% (EC <sub>20</sub> = 81,10%) (EC <sub>50</sub> = 160,40%)	< 20%	< 20%
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti (% massimo effetto) (su elutriato con pH corretto a 7,2)	Non eseguito	Non eseguito	Non eseguito	< 20%	Non eseguito	Non eseguito
Tossicità acuta con batteri bioluminescenti – fase solida (STI)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Tossicità acuta con <i>Artemia sp.</i> (su elutriato)% mortalità	0	0	0	0	0	0
Tossicità acuta con rotiferi ( <i>B. plicatilis</i> ) (su elutriato)% mortalità	0	0	0	0	0	0
pH elutriato	8,47	8,42	8,27	8,52	8,11	8,16
	6/6/2011	20/6/2011	25/7/2011	8/8/2011	22/8/2011	5/9/2011
Classe-tossicità	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente	Classe B Tossicità media	Classe A Tossicità assente	Classe A Tossicità assente
Classe-tossicità (pH elutriato corretto a 7,2)				Classe A Tossicità assente		

Tabella 4.7 – *Andamento del pH dell'acqua di scarico nei tre punti di campionamento*



Punto di campionamento	pH						pH ottimale
	06/06	20/06	25/07	08/08	22/08	05/09	
scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lupaio	9,34	8,64	9,25	9,32	7,83	8,97	6 – 8,5
scarico finale a mare	8,50	8,36	9,23	8,91	8,20	9,11	
scarico sodiera fosso Bianco	9,25	8,95	9,10	9,28	8,65	9,17	

Tabella 4.8 – *Concentrazione della pelite nella frazione solida delle acque di scarico*

<b>Punto campionamento</b>	<b>Data campionamento</b>	<b>% pelite</b>
scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lupaio	06/06/2011	95,71
scarico finale a mare	06/06/2011	90,91
scarico sodiera fosso Bianco	06/06/2011	97,5
scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lupaio	20/06/2011	96,32
scarico finale a mare	20/06/2011	87,93
scarico sodiera fosso Bianco	20/06/2011	90,34
scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lupaio	25/07/2011	89,95
scarico finale a mare	25/07/2011	91,61
scarico sodiera fosso Bianco	25/07/2011	90,88
scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lupaio	08/08/2011	96,72
scarico finale a mare	08/08/2011	95,24
scarico sodiera fosso Bianco	08/08/2011	93,46
scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lupaio	22/08/2011	89,73
scarico finale a mare	22/08/2011	92,53
scarico sodiera fosso Bianco	22/08/2011	95,42
scarico generale confluenza fosso Bianco fosso Lupaio	05/09/2011	>90%
scarico finale a mare	05/09/2011	>90%
scarico sodiera fosso Bianco	05/09/2011	>90%

## 5 CONCLUSIONI

### 5.1 Scarichi

Gli scarichi sono caratterizzati da elevata salinità (>50‰), da elevato pH (>8.5) e da una notevole quantità di solidi sospesi con % di pelite >90%. L'andamento del pH è riportato nella tabella 4.7.

**La componente degli scarichi privata dei solidi sospesi** è risultata priva di tossicità acuta sia per *Artemia* sp. che per *Brachionus* sp. in tutti i campioni analizzati.

La tossicità rilevata con *Vibrio fischeri* nella quasi totalità dei campioni analizzati (5 su 6) prelevati allo scarico sodiera e scarico generale, nonché in misura minore allo scarico finale in mare (2 su 6), sembra essere correlata soprattutto con il pH. Infatti, quando il campione presenta il pH nel range ottimale di applicabilità del saggio la % di inibizione della bioluminescenza risulta <20 (assenza di tossicità). A conferma di ciò, quando viene neutralizzato in laboratorio il pH > 8.5 e riportata al 35‰ la salinità dei campioni positivi, il saggio risulta negativo. Soltanto i campioni prelevati il 5 settembre allo scarico sodiera e allo scarico generale, pur presentando un pH >8,5, rispettivamente 9,17 e 9,11 hanno evidenziato assenza di tossicità senza correzione del pH e della salinità.

**I solidi sospesi di tutti gli scarichi** analizzati hanno evidenziato assenza di tossicità (STI<1) in 5 campioni su 6. I campioni prelevati il 20.06.11 hanno evidenziato un valore di STI >1, ma comunque sempre <3 (valore massimo reperito 1,68 allo scarico generale), che è il valore riferito a tossicità trascurabile (APAT-ICRAM, 2007).

### 5.2 Sedimenti e sabbie

**5.2.1 Le analisi sono state effettuate sui sedimenti** prelevati in prossimità della confluenza nel fosso a mare.

**I saggi effettuati sugli elutriati** con *Artemia* sp e *Brachionus* sp sono risultati negativi in tutti i campioni analizzati, mentre quelli effettuati con *V. fischeri* hanno evidenziato tossicità media nel 50% dei campioni analizzati (3 su 6). La tossicità riscontrata, anche in questo caso sembra essere correlata soprattutto con il pH, infatti, quando viene neutralizzato in laboratorio il pH > 8.5 dei 3 campioni con tossicità evidente, il saggio risulta negativo.

**Il saggio su fase solida** con batteri bioluminescenti ha dato esito negativo in tutti i campioni analizzati (STI<1)

**5.2.2 Le analisi sono state effettuate sulle sabbie** prelevate 100 m a nord ed a sud dello scarico in mare..

**I saggi effettuati sugli elutriati** con *Artemia* sp e *Brachionus* sp sono risultati negativi in tutti i campioni analizzati, mentre quelli effettuati con *V. fischeri* hanno evidenziato tossicità media in 2 campioni su 6 nei campioni 100 m a nord e in 1 su 6 nei campioni 100 m a sud. Ancora una volta il saggio risulta negativo quando il pH > 8.5 dei tre campioni tossici viene neutralizzato in laboratorio.

**Il saggio su fase solida** con batteri bioluminescenti ha dato esito negativo in tutti i campioni analizzati (STI<1)





## 6 SIGLE E ABBREVIAZIONI

EC <sub>50</sub>	Concentrazione efficace sul 50% degli organismi
EC <sub>20</sub>	Concentrazione efficace sul 20% degli organismi
ARPAT	Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana
MATTM	Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare
AIA	Environmental Supplemented Authorization
D.Lgs.	Decreto Legislativo
SPT	Solid Phase Test
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
STI	Sediment Toxicity Index
rpm	Giri al minuto (riferito ad una centrifuga)
UT	Unità Tossiche

## 7 BIBLIOGRAFIA

- HALBACH U., WIEBERT M, WESTERMAYER M, WISSEL C. 1983  
Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments *Ecotox. Envir. Safety* 7:484-513
- APAT ICRAM (2007) – Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini
- APAT IRSA CNR (2003) – Manuale 29/03; metodo 8030
- APAT IRSA CNR (2003) – Manuale 29/03; metodo 8060
- ARNER M., KOIVISTO S. 1993  
Effects of salinity on metabolism and life history characterization of *Daphnia magna* *Hydrobiologia* 259:69-77
- EPA Technical support document for water quality-based toxics control. 1991
- ICRAM (2001) - Metodi Analitici di Riferimento
- PERSOONE, G., B. MARSALEK, I. BLINOVA, et al. 2003.  
A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ. Toxicol.* 18:395-402
- SCHUYTEMA, G. S., A. V. NEBEKER, AND T. W. STUTZMAN. 1997.  
Salinity tolerance of *Daphnia magna* and potential use for estuarine sediment toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 194–198
- SNELL TW, PERSOONE G. 1989  
Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environment with *B. plicatilis* *Aquatic Toxicology* 14:65-80