



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Prove di confronto sui risultati delle analisi di caratterizzazione dei sedimenti dell'avamposto per navi Ro Ro del Porto Canale di Cagliari

Responsabile scientifico

David Pellegrini

Collaboratori

*Andrea La Camera, Fabiano Pilato, Valentina Vitiello, Enrichetta Barbieri,
Simona Macchia, Davide Sartori, Alice Scuderi, Gianluca Chiaretti*

2012 (Revisione 2016)

INDICE

1. PREMESSA.....	3
2. MATERIALI E METODI	3
2.1 ANALISI GRANULOMETRICHE	4
2.2 METALLI	4
2.3 ANALISI ECOTOSSICOLOGICHE	5
3. RISULTATI E CONFRONTI.....	11
3.1 ANALISI GRANULOMETRICHE	11
3.2 ANALISI CHIMICHE (REVISIONE 2016)	14
3.3 ANALISI ECOTOSSICOLOGICHE	18
3.4 SAGGIO BIOLOGICO CON <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i>	19
3.5 SAGGIO BIOLOGICO CON <i>COROPHIUM ORIENTALE</i>	21
4. CONCLUSIONI	22

1. Premessa

Scopo dello studio effettuato dal Cibm era la descrizione delle caratteristiche fisiche, chimiche, microbiologiche ed eco tossicologiche dei sedimenti delle aree interessate dai lavori di dragaggio da eseguirsi nell'ambito dell'intervento di "banchinamento dell'avamposto per navi Ro Ro del Porto Canale".

Il Piano di campionamento e la tipologia di analisi da effettuare sui campioni di sedimento sono state stabilite dall'Autorità Portuale di Cagliari secondo quanto previsto dagli artt.i 9 e 19 del Regolamento della Provincia di Cagliari, mentre, le attività di carotaggio sono state effettuate da una ditta specializzata che ha fornito le carote di sedimento per la preparazione delle aliquote da sottoporre ad analisi, e, mediante carotaggi aggiuntivi, aliquote di sedimento, da non sottoporre ad analisi, ma da conservare in maniera adeguata come eventuale successivo controllo.

ISPRA, in qualità di soggetto di natura pubblica e a suo tempo parte del Consorzio, ha avuto il ruolo di supervisore nelle attività di preparazione delle aliquote, oltre che quello di effettuare le analisi di validazione sul 10% dei campioni. In particolare, è stato concordato di effettuare, su 7 campioni, analisi relative alla Granulometria e ai Metalli mentre, su 4 campioni è stata effettuata la validazione dei Saggi biologici.

2. MATERIALI E METODI

La validazione delle Analisi granulometriche e Metalli è stata eseguita sui seguenti 7 campioni, di cui si riportano le rispettive sigle:

1. P2 50-100
2. P3 50-100
3. P8 150-200
4. P9 100-150
5. P10 50-100
6. P14 50-100
7. P12 50-100

La validazione dei saggi biologici è stata eseguita sui seguenti 4 campioni:

1. P2 50-200
2. P7 50-200
3. P8 150-200
4. P13 50-200

2.1 Analisi granulometriche

L'attività analitica riguardante la determinazione delle caratteristiche granulometriche è stata dedicata al frazionamento delle sabbie, oltre che all'individuazione delle tre frazioni principali (ghiaia, sabbia e pelite). L'analisi granulometrica è stata suddivisa in tre fasi:

- *Preparazione e pretrattamento del campione.* Ogni campione è stato trattato con una soluzione di perossido di idrogeno per 48 ore a temperatura ambiente, al fine di facilitare la disgregazione del sedimento, e successivamente lavato con acqua distillata per rimuovere i sali presenti.
- *Separazione della frazione sabbiosa da quella pelitica.* Ciascun campione è stato setacciato in umido su rete d'acciaio da 63 mm; le due frazioni ottenute sono state essiccate in stufa a 105 °C e successivamente pesate.
- *Analisi delle frazioni.* La frazione > 63 µm (sabbia e ghiaia) è stata vagliata con pile di setacci da -1 a 4 phi, con un intervallo di 0,5 phi (phi = - log2 del diametro in mm) della serie ASTM; il sedimento corrispondente a ciascun intervallo è stato pesato e al termine delle operazioni è stato calcolato il peso dell'intera frazione.

La frazione < 63 µm rappresenta la pelite.

2.2 Metalli

Il campione (circa 0.3 g s.s.) è stato mineralizzato in bombe in teflon, con l'impiego di un forno a microonde opportunamente programmato (Milestone 1200), mediante l'aggiunta di 3 ml di HNO₃ (65%) e di 1 ml di HCl (30%) ultrapuri. Alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità di acqua ultrapura tale da raggiungere il volume finale di 25 ml. La determinazione analitica è stata effettuata mediante l'impiego di Spettrofotometria ad Emissione Ottica (Varian Liberty AX Sequential ICP-OES 720) per tutti i metalli a eccezione del mercurio. Per quest'ultimo le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di Spettroscopia ad Assorbimento Atomico (metodo dei Vapori Freddi; Cetac M-7600). L'accuratezza della metodica è stata valutata impiegando il materiale standard di riferimento LGC 6137 (Promochem), che è stato processato con le stesse modalità dei campioni.

Il limite di rilevabilità della metodica e il limite di quantificazione per ogni metallo analizzato è riportato in Tabella 1.

Tab. 1 – Limiti di rilevabilità e di quantificazione

	Al	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn
Rilevabilità (mg/l)	0,078	0,0005	0,00004	0,0061	0,0035	0,0004	0,0071	0,0036	0,027	0,1672
Quantificazione (mg/kg)	6,50	0,0441	0,0029	0,512	0,2951	0,0369	0,5907	0,2998	2,2499	13,93

2.3 Analisi ecotossicologiche

2.3.1 Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri è un batterio marino Gram-negativo ed eterotrofo, appartenente alla famiglia delle Vibrionaceae. E' cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali.

Il sistema Microtox® è un test biologico di tossicità acuta basato sull'utilizzo della bioluminescenza naturale di questa specie. Poiché in presenza di contaminanti l'emissione di luce da parte di *V. fischeri* diminuisce, la misura dell'eventuale inibizione della bioluminescenza a seguito dell'esposizione del batterio ad una sostanza nota o ad un campione naturale di acqua o sedimento, consente di valutare il grado di tossicità della sostanza o della matrice testata.

Il sistema di misura risulta piuttosto versatile in quanto è applicabile a matrici naturali, sia continentali che marine, acquose (acqua potabile, acqua interstiziale, elutriato, ecc.) e solide (fanghi, suoli, sedimenti), nonché a soluzioni acquose di sostanze tossiche pure, sia organiche che inorganiche.

L'emissione della bioluminescenza è stata misurata all'interno del luminometro termostato M500, dotato di pozzetti termostatati a 15 °C per i controlli e i campioni e a 4°C per il reagente.

Preparazione delle matrici ambientali

I saggi biologici sono stati applicati all'elutriato. Gli elutriati sono stati preparati miscelando aliquote di sedimento ed acqua di mare artificiale ISO in rapporto 4:1 di peso secco, lasciando le miscele in agitazione per un'ora e centrifugando per 20 minuti a 3500 rpm.

Il sovrantante, filtrato a 0.45 µm al fine di eliminare eventuali particelle di sedimento in sospensione in grado di determinare interferenze ottiche, è stato successivamente utilizzato per il saggio entro 24 h dalla preparazione della matrice.

Protocollo di riferimento e procedura adottata

Per i campioni di acqua marina è stato applicato il test per l'individuazione di una curva dose-effetto (Basic test, Azur Environmental, 1995a), organizzato con 4 diluizioni del campione a partire dal 90%, effettuando le letture dopo esposizione di 5, 15 e 30 minuti. Tale procedura è riconducibile al protocollo ISO (2006), specifico per batteri liofilizzati.

La relazione dose-risposta, ovvero concentrazione del campione-inibizione della bioluminescenza, è stata elaborata mediante un software dedicato (Microtox Omni™ v. 1.16), che consente di individuare l'EC50 (o qualunque altra EC), ossia la concentrazione del campione cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50% o, in alternativa, la semplice variazione percentuale di emissione di luce rispetto al controllo.

Nei campioni il risultato è stato espresso come EC50 nel caso questa sia risultata inferiore al 90%, come EC20 se questa è risultata calcolabile (<90%) o come semplice effetto massimo quando anche la EC20 è risultata maggiore del 90%.

I campioni sono stati considerati tossici quando è stata individuata almeno una EC20 inferiore o uguale al 90%. La scala di tossicità di riferimento adottata (Tab. 2) è quella derivante dal “Manuale per la movimentazione dei sedimenti marini” (APAT-ICRAM, 2007).

Tabella 2 – Scala di tossicità acuta utilizzata nel saggio biologico mediante *V. fischeri*

<i>Vibrio fischeri</i> elutriato	Tossicità
EC20 ≥ 90%	Assente/Trascurabile
EC20 < 90% e EC50 ≥ 90%	Media
20% ≤ EC50 < 90%	Alta
EC50 < 20%	Molta elevata

2.3.2 Saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

L'affidabilità del riccio di mare come bioindicatore è riconosciuta a livello mondiale e già negli anni '80 i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono stati inclusi nella lista ICES (1997) dei test biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino. Procedure standard per i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono state messe a punto per le specie della costa orientale (*Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus droebachiensis*) e per quelle della costa occidentale (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Dendraster excentricus*) degli Stati Uniti (USEPA, 1994, 1995, 2000; ASTM, 1995, 2004) e per il Canada (Environment Canada, 1992). In Italia, la specie autoctona *Paracentrotus lividus*, ha trovato applicazione in campo ecotossicologico in particolare per quanto riguarda lo studio degli effetti sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale (difetti nello sviluppo e aberrazioni mitotiche) di sostanze pure e di effluenti. In effetti, il saggio biologico con *P. lividus* può essere impiegato sia nella valutazione della qualità di matrici ambientali (acque e sedimenti marini) sia nella stima della tossicità di sostanze o preparati solubili in acqua di mare. In particolare, per quanto riguarda i sedimenti marini esso è compatibile con l'acqua interstiziale e l'elutriato.

Matrici acquose testate

La matrice ambientale soggetta alla valutazione ecotossicologica in questo saggio biologico è l'elutriato. L'elutriato fornisce informazioni su tutte quelle componenti estraibili in acqua. Quest'ultima rappresenta una delle matrici più indicative nello studio degli effetti della movimentazione dei fondali (ASTM, 1991; USACE, 1991) come nei dragaggi portuali, nei siti di discarica, ecc.

Preparazione dell'elutriato

L'elutriato è stato preparato in accordo con il protocollo standard US EPA (1991) combinando in peso quattro parti di acqua filtrata prelevata da una zona non contaminata con una parte di sedimento. Il tutto è stato messo ad agitare per 1 h a 400 giri/min. La fase liquida è stata quindi raccolta e centrifugata per 20 min a 3500 giri/min. Subcampioni di surnatante sono stati congelati e utilizzati nei vari test, in modo da impiegare sempre lo stesso campione nel corso dei vari esperimenti. Il congelamento infatti non sembra alterare in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti (NO₃ e PO₄) della fase liquida (Clementson & Wayte, 1992) e uno studio condotto da Carr e Chapman (1995) ha permesso di verificare l'assenza di differenze significative tra la tossicità di campioni di matrici acquose appena estratte o congelate. Il congelamento è pertanto un passaggio indispensabile per garantire la confrontabilità fra i dati sperimentali, in quanto permette di stoccare adeguatamente i subcampioni rendendoli disponibili per la ripetizione del saggio in periodi diversi.

L'elutriato viene testato sia non diluito (100%) che diluito ai valori di diluizione di 25% e 50%. In questo caso l'elutriato viene diluito sia con acqua di mare filtrata che con acqua ricostituita.

Raccolta degli organismi

Per assicurare la maturità sessuale, i ricci di mare adulti vengono raccolti tra Settembre e Maggio (Fenaux, 1968). Esemplari adulti sono stati prelevati da fondali rocciosi del litorale di Livorno in una zona distante da fonti di inquinamento antropico (scarichi urbani e industriali).

Tutti i ricci (40-50) vengono raccolti ad una profondità tra 1 e 3 m. Gli animali raccolti sono stati posti in un contenitore di plastica e ricoperti con abbondante carta bibula umida per minimizzare lo stress da trasporto ed evitare così possibili emissioni di gameti. In laboratorio gli esemplari vengono posti in una camera termostata, in acquari di vetro contenenti acqua di mare raccolta nello stesso sito di campionamento e dotati di un sistema di areazione e di filtraggio (20-30 individui per 100 l di acqua). Periodicamente vengono controllati temperatura ($16\pm 1^{\circ}\text{C}$), salinità (34‰ - 38‰), pH (7,8-8,2), ammoniaca e nitrati. In questo modo i ricci sono mantenuti in condizioni stabili, almeno per una settimana.

Modalità di esecuzione del test di spermiossicità

La metodologia segue il protocollo messo a punto da Dinnel et al. (1987), in accordo con le procedure standard descritte in US EPA(1991, 1994, 1995) e riprese dalla ASTM (1991, 1995) e dalla EPS (1991, 1992). La scelta di alcuni parametri utilizzati si basa su dati riportati in letteratura (Giambartolomei, 1990; Galarin et al., 1992; Arizzi Novelli et al., 2001; Ennas et al., 2002; Lera, Tesi 2002; Lera e Pellegrini, 2006 a ; Lera et al, 2006 b).

Il saggio consiste nell'espore un numero definito di gameti maschili per 1 h ad una sostanza tossica o ad una matrice acquosa complessa di cui si vuole valutare la tossicità. Lo scopo è di valutare l'efficacia della fecondazione rispetto a un controllo negativo. Successivamente vengono aggiunte le uova e dopo 20 minuti il test viene bloccato con l'aggiunta di formalina. Il rapporto sperma:uova adottato è di 15000:1 con 1000 uova in 10 ml di soluzione test. Al termine delle prove vengono conteggiate le uova fecondate e calcolate le percentuali di fecondazione corrispondenti alle diverse diluizioni della matrice acquosa complessa testata.

Tutte le fasi del test descritte in seguito sono da considerarsi effettuate in parallelo, sia con acqua di mare ricostituita sia con acqua di mare naturale filtrata, in modo da valutare eventuali differenze nella risposta del saggio.

Elaborazione dei risultati

L'effetto della sostanza testata, di cui si vuole valutare la tossicità, viene rilevato dalla percentuale di uova non fecondate rispetto a un controllo di acqua di mare. Come abbiamo detto in precedenza, il test viene considerato accettabile se il tasso di fecondazione del controllo oscilla tra il 70%-90%. Applicando la formula di Abbott (Finney, 1971), la percentuale di uova non fecondate in ogni camera test viene confrontata e normalizzata rispetto al controllo.

$$\text{Abbott} = (X-Y)/(100-Y) \cdot 100$$

X=% di uova non fecondate nel campione da testare Y=% di uova non fecondate nel controllo

I valori così ottenuti vengono impiegati in due elaborazioni differenti: per quanto riguarda i campioni, la loro eventuale tossicità viene valutata mediante il calcolo dell' EC20 e dell' EC50 ottenuti con lo specifico programma Tox Calc 5.0 mediante il metodo della Probit Analysis. I valori ottenuti vengono confrontati con la scala di tossicità riportata in Tabella 3 ed il campione può essere valutato contaminato o non contaminato.

Tabella 3 – Scala di tossicità del saggio con *P. lividus*

EC20/EC50	Tossicità
EC20 ≥ 90%	Assente/Trascurabile
EC20 < 90% e EC50 > 100%	Media
40% ≤ EC50 ≤ 100%	Alta
EC50 < 40%	Molta elevata

Per il rame, invece, i valori di EC50 vengono ottenuti utilizzando due metodi statistici differenti: il Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1978) e la Probit Analysis (Finney, 1971). Il valore

dell'EC50 indica la concentrazione della sostanza di prova ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (1000 mg/l)) che causa una riduzione della fecondazione del 50% rispetto a un controllo negativo.

2.3.3 Saggio biologico con *Corophium orientale*

Corophium orientale è un crostaceo appartenente al gruppo degli anfipodi. E' un organismo fossorio di acque salmastre, endemico del Mar Mediterraneo, impiegato con successo come specie target in ecotossicologia per la valutazione della tossicità dei sedimenti marini (Onorati *et al.*, 1999).

Protocolli di riferimento e procedura adottata

Il saggio è stato eseguito secondo le metodiche riportate in "ISO 2005. Water Quality - Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediments to amphipods" e secondo quanto riportato in Bigongiari *et al.* (2001).

Gli organismi sono stati raccolti e selezionati in campo in base alla classe di taglia desiderata (2-4 mm). Per ogni campione sono state allestite 4 repliche. Circa 200 cc di sedimento da testare e circa 750 cc d'acqua di mare filtrata sono stati posti in contenitori becker da 1 litro. Dopo una opportuna ossigenazione, sono stati introdotti nei becker 25 organismi.

Il saggio biologico utilizzato nelle analisi ha durata di 10 giorni e l'endpoint preso in considerazione è la mortalità. La valutazione qualitativa dei sedimenti è stata effettuata tenendo conto della differenza matematica (Δm) tra la mortalità ritrovata nel campione da saggiare e la mortalità nel controllo.

All'inizio e al termine dei test sono stati controllati alcuni parametri chimico-fisici (pH, temperatura, salinità e O_2 disciolto) fonti di possibili stress per gli organismi.

La sensibilità degli anfipodi è stata valutata determinando il valore di LC50 (concentrazione alla quale si verifica la morte del 50% degli individui) con il cloruro di cadmio. A tal fine gli organismi sono stati posti in soluzioni acquose a concentrazioni crescenti di CdCl_2 per 96 h, in assenza di sedimento. Il valore di LC50 e i relativi limiti di confidenza al 95% sono calcolati con il metodo Trimmed Spearman-Kärber.

Il saggio biologico a lungo termine è considerato valido quando nel sedimento di controllo la mortalità media è $\Delta \leq 10\%$. E' stata calcolata la media della mortalità \pm la deviazione standard (espressa in %) nel periodo di esposizione considerato, sia nei sedimenti da testare che nel sedimento di controllo. I dati di mortalità di ogni campione sono quindi confrontati con quelli del sedimento di controllo.

La valutazione della tossicità è eseguita prendendo in considerazione la mortalità ritrovata nei campioni da saggiare corretta con la formula di Abbott (Δm).

La scala adottata per la classificazione ecotossicologica è quella riportata nel Manuale ICRAM- APAT (2007) e di seguito riportata in Tabella 4.

Tab. 4 – Scala di tossicità relativa al test a 10 giorni con *Corophium orientale*

Mortalità corretta con Abbott	Tossicità
$M \leq 15\%$	Assente/Trascurabile
$15\% < M \leq 30\%$	Media
$30\% < M \leq 60\%$	Alta
$M > 60\%$	Molta elevata

3. RISULTATI E CONFRONTI

3.1 Analisi granulometriche

In tabella 5 vengono riportati risultati delle analisi granulometriche Ispra effettuate su 7 campioni e in tabella 6 i corrispondenti risultati, per i medesimi campioni, effettuati dal CIBM.

Tab. 5 – Risultati Granulometria Ispra

Campione Ispra	Ghiaia Ispra (%)	Sabbia Ispra (%)	% Fraz. <63 μ m Ispra	Classificazione wentworth
1-P2 50/100	5,26	62,11	32,63	
2- P3 50/100	6,45	81,29	12,26	
3-P8 150/200	11,49	52,48	36,02	
4- P9 100/150	2,68	32,59	64,73	
5- P10 50/100	3,62	59,90	36,47	
6-P12 50/100	7,42	66,07	26,52	
7-P14 50/100	1,52	41,92	56,57	

Tab. 6– Risultati Granulometria CIBM

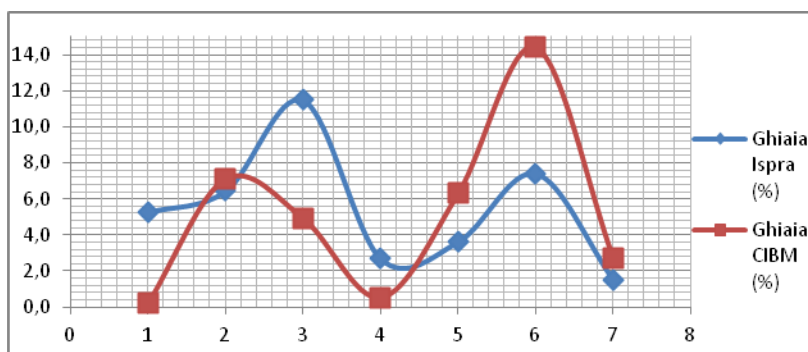
Campione CIBM	Ghiaia CIBM (%)	incertezza	Sabbia (%) CIBM	incertezza	% Fraz.<63 μ m CIBM	incertezza	Classificazione wentworth
1-P2/50-100	0,2	$\pm 0,6$	40,1	$\pm 2,2$	59,7	$\pm 4,2$	
2-P3/50-100	7,1	$\pm 1,0$	61,3	$\pm 2,1$	31,7	$\pm 2,4$	
3-P8/150-200	4,9	$\pm 0,9$	52	$\pm 2,2$	43	$\pm 3,2$	
4-P9/100-150	0,5	$\pm 0,6$	30,8	$\pm 2,1$	68,7	$\pm 4,8$	
5-P10/50-100	6,3	$\pm 0,9$	52,9	$\pm 2,4$	40,9	$\pm 3,0$	
6-P12/50-100	14,4	$\pm 1,5$	62	$\pm 2,3$	23,6	$\pm 1,9$	
7-P14/50-100	2,7	$\pm 0,7$	43,2	$\pm 2,2$	54,1	$\pm 3,9$	

Di seguito sono riportati i grafici con i confronti effettuati separatamente sulle tre frazioni granulometriche (Ghiaia, Sabbia, Frazione fine).

3.1.1 Confronto Ghiaia

Nel Grafico 1 si riporta il confronto tra le due misure relative alle percentuali di ghiaia trovate in ciascuno dei 7 campioni analizzati da Ispra e dal CIBM, mentre, in Tabella 7 vengono riportati i singoli dati numerici.

Graf.1- Confronto analisi granulometriche: **Ghiaia**



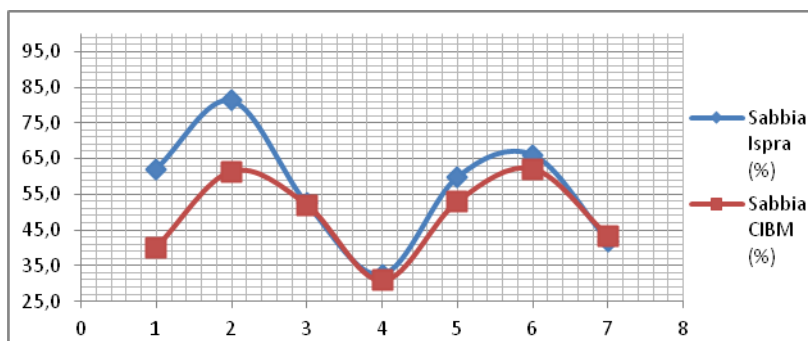
Tab.7 – Confronto Ghiaia

	Campione Ispra	Ghiaia Ispra (%)	Ghiaia CIBM (%)	Delta	scost. (%)
1	P2 50/100	5,3	0,2	5,1	-0,96
2	P3 50/100	6,5	7,1	-0,6	0,10
3	P8 150/200	11,5	4,9	6,6	-0,57
4	P9 100/150	2,7	0,5	2,2	-0,81
5	P10 50/100	3,6	6,3	-2,7	0,74
6	P12 50/100	7,4	14,4	-7,0	0,94
7	P14 50/100	1,5	2,7	-1,2	0,78

3.1.2 Confronto Sabbia

Nel Grafico 2 si riporta il confronto tra le due curve relative alle percentuali di sabbia trovate in ciascuno dei 7 campioni analizzati da Ispra e dal CIBM, mentre, in Tabella 8 vengono riportati i dati numerici delle due curve.

Graf.2- Confronto analisi granulometriche: **Sabbia**



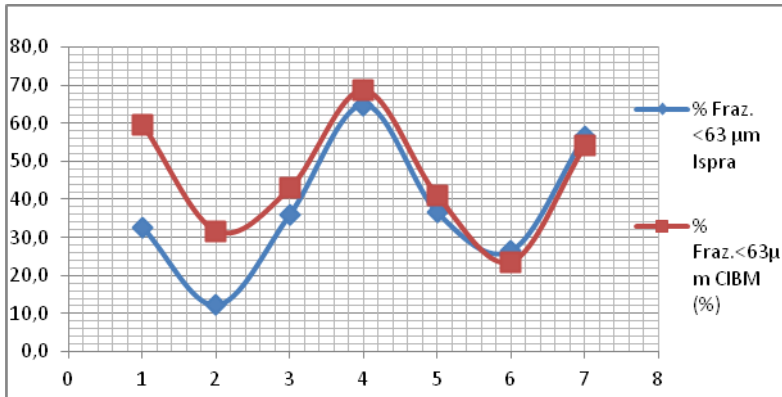
Tab.8 – Confronto sabbia

	Campione Ispra	Sabbia Ispra (%)	Sabbia CIBM (%)	Delta	scost. (%)
1	P2 50/100	62,1	40,1	22,0	-0,35
2	P3 50/100	81,3	61,3	20,0	-0,25
3	P8 150/200	52,5	52	0,5	-0,01
4	P9 100/150	32,6	30,8	1,8	-0,05
5	P10 50/100	59,9	52,9	7,0	-0,12
6	P12 50/100	66,1	62	4,1	-0,06
7	P14 50/100	41,9	43,2	-1,3	0,03

3.1.3 Confronto fraz <63 µm

Nel Grafico 3 si riporta il confronto tra le due curve relative alle percentuali di sabbia trovate in ciascuno dei 7 campioni analizzati da Ispra edal CIBM, mentre, in Tabella 9 vengono riportati i dati numerici delle due curve.

Graf.3- Confronto analisi granulometriche: **frazione < 63 µm**



Tab.9 – Confronto frazione < 63 µm

	Campione Ispra	% Fraz. < 63 µm Ispra	% Fraz. < 63 µm CIBM	Delta	scostam. percent (%)
1	P2 50/100	32,6	59,7	-27,1	0,83
2	P3 50/100	12,3	31,7	-19,4	1,59
3	P8 150/200	36,0	43	-7,0	0,19
4	P9 100/150	64,7	68,7	-4,0	0,06
5	P10 50/100	36,5	40,9	-4,4	0,12
6	P12 50/100	26,5	23,6	2,9	-0,11
7	P14 50/100	56,6	54,1	2,5	-0,04

3.2 Analisi chimiche (revisione 2016)

Alla luce della recente modifica normativa apportata dal D.Lgs. n.173 del 15 Luglio 2016 si riporta la tabella dei livelli chimici di riferimento nazionale per gli elementi in tracce.

Tab.10- Valori limite L2 dell'allegato tecnico di cui al decreto attuativo art.109 comma 2 lettera a), D.lgs.152/06 così come approvato con D.Lgs. n.173 del 15 Luglio 2016.

PARAMETRO	L2 [mg/Kg ⁻¹]p.s.
Arsenico	20
Cadmio	0,80
Cromo	150
Cr VI	2
Rame	52
Mercurio	0,80
Nichel	75
Piombo	70
Zinco	150

Nella fase di validazione sono stati considerati i soli elementi interessati dalla normativa **escludendo Al e V**. La fase di validazione dei risultati analitici è avvenuta tramite analisi di una quota di campioni da parte di ISPRA. La procedura prevede inizialmente il confronto tra i dati appaiati del Laboratorio di Parte e di ISPRA, tenuto conto del termine di incertezza. La procedura consiste in distinti e successivi step:

- Verifica dell'accordo dei risultati con il semplice confronto dei casi in cui i dati siano maggiori (sottraendone prima l'incertezza) o inferiori (sommandone prima l'incertezza) dei valori L2 di cui alla Tabella10. Nei casi in cui entrambi i dati di ISPRA e CIBM incrementati delle relative incertezze non oltrepassino il valore L2, oppure analogamente siano superiori ai valori suddetti, seppur sottratti delle relative incertezze, la validazione avviene senza ulteriori confronti statistici. Nel presente studio sono stati presi a riferimento i valori soglia indicati nella tabella 10 e come stima della incertezza è stato considerato un valore pari a 1/3 del valore soglia.
- Nei casi in cui anche per una sola coppia si determinano diverse condizioni in cui per i dati di un laboratorio oltrepassano (seppur sottratta l'incertezza) i valori L2 a differenza di quelli dell'altro laboratorio oppure analogamente siano al di sotto dei predetti limiti (seppur aggiunta l'incertezza), si applica un confronto dei dati appaiati di ISPRA e del laboratorio di parte al fine di valutare l'esistenza di differenze comprese entro limiti prestabiliti o comunque non significativi (ad esempio compresi nell'incertezza di cui sopra scelta magari in modo troppo cautelativo al punto da invalidare il dato). Nel caso in cui le discordanze siano dovute ai margini di incertezza stessi, i dati saranno validati. Invece, nel caso in cui attraverso l'utilizzo di test

statistici risultino ancora differenze significative tra i dati di ISPRA e quelli del laboratorio CIBM, allora i dati saranno non validati.

Di seguito si riportano i dati delle analisi condotte dai due laboratori, confrontati con i valori limite L2 e successivamente aumentati o diminuiti delle incertezze come indicato nel precedente capoverso.

Tab.11- Risultati analisi CIBM. Evidenziati i valori che oltrepassano i limiti L2 di Tabella10.

CIBM [mg/Kg-1]p.s.	Al	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
L2		20	0,8	150	52	75	70		150	0,8
P9 150-200	-	16,50	0,19	36,31	16,86	24,58	23,53	-	109,12	0,29
P2 50-100	-	23,84	0,15	36,71	14,58	21,83	14,50	-	100,02	0,10
P8 150-200	-	7,67	0,10	22,06	9,57	11,87	8,95	-	60,57	0,05
P3 50-100	-	15,67	0,07	20,62	10,25	21,36	9,06	-	49,46	1,39
P14 50-100	-	16,03	0,10	51,04	17,23	28,51	19,68	-	122,79	0,11
P12 50-100	-	8,50	0,13	18,56	9,99	11,46	47,79	-	63,52	0,12
P10 50-100	-	9,68	0,18	16,69	10,72	10,07	14,02	-	63,12	0,13

Tab.12- Risultati analisi CIBM con applicata l'incertezza. Evidenziati i valori che oltrepassano i limiti L2 di Tabella10.

CIBM [mg/Kg-1]p.s.	Al	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
L2		20	0,8	150,00	52	75	70		150	0,8
P9 150-200	-	23,17	0,46	86,31	34,19	49,58	46,86	-	159,12	0,56
P2 50-100	-	17,17	0,42	86,71	31,91	46,83	37,83	-	150,02	0,37
P8 150-200	-	14,34	0,37	72,06	26,90	36,87	32,28	-	110,57	0,32
P3 50-100	-	22,34	0,34	70,62	27,58	46,36	32,39	-	99,46	1,12
P14 50-100	-	22,70	0,37	101,04	34,56	53,51	43,01	-	172,79	0,38
P12 50-100	-	15,17	0,40	68,56	27,32	36,46	71,12	-	113,52	0,39
P10 50-100	-	16,35	0,45	66,69	28,05	35,07	37,35	-	113,12	0,40

Nella Tabella12 sono state addizionate le incertezze ai dati che non oltrepassavano i limiti L2 e sono state detratte da quelli che li oltrepassavano. Analogamente si procede per i dati delle successive Tabella13 e Tabella14.

Tab.13- Risultati analisi ISPRA. Evidenziati i valori che oltrepassano i limiti L2 di Tabella10.

ISPRA [mg/Kg-1]p.s.	Al	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
L2	-	20	0,8	150	52	75	70	-	150	0,8
P9 150-200	-	31,57	0,23	67,32	18,91	39,71	53,16	-	99,03	0,13
P2 50-100	-	44,06	0,24	34,02	15,00	21,10	46,36	-	123,88	0,09
P8 150-200	-	19,20	0,15	27,25	11,41	15,00	27,42	-	174,08	0,07
P3 50-100	-	7,19	0,06	22,44	8,77	15,87	22,66	-	93,67	0,17
P14 50-100	-	34,24	0,20	39,11	18,42	22,29	52,73	-	108,61	0,09
P12 50-100	-	2,00	0,23	18,81	10,44	11,18	47,94	-	115,23	0,34
P10 50-100	-	3,35	0,12	15,66	9,45	8,37	25,95	-	127,95	0,12

Tab.14- Risultati analisi ISPRA con applicata l'incertezza. Evidenziati i valori che oltrepassano i limiti L2 di Tabella10.

ISPRA [mg/Kg-1]p.s.	Al	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
L2	-	20	0,8	150	52	75	70	-	150	0,8
P9 150-200	-	24,91	0,49	117,32	36,24	64,71	76,50	-	149,03	0,39
P2 50-100	-	37,39	0,51	84,02	32,34	46,10	69,69	-	173,88	0,36
P8 150-200	-	25,87	0,42	77,25	28,75	40,00	50,76	-	124,08	0,34
P3 50-100	-	13,86	0,33	72,44	26,10	40,87	45,99	-	143,67	0,43
P14 50-100	-	27,58	0,47	89,11	35,76	47,29	76,06	-	158,61	0,36
P12 50-100	-	8,67	0,49	68,81	27,77	36,18	71,28	-	165,23	0,60
P10 50-100	-	10,02	0,38	65,66	26,78	33,37	49,29	-	177,95	0,39

Per applicare la validazione si utilizzeranno i dati delle tabelle 12 e 14. In caso di discordanza, si verificherà se essa permane anche applicando i dati delle tabelle 11 e 13. In seguito si emetteranno i risultati delle validazioni.

Tab.15- Validazione risultati per Arsenico. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

As - L2=20			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200			Si	
P2 50-100	17,17	37,39	si	i limiti d'accordo delle differenze sono contenuti con differenze statisticamente non significative
P8 150-200	14,34	25,87	Si	i limiti d'accordo delle differenze sono contenuti con differenze statisticamente non significative
P3 50-100	22,34	13,86	Si	i limiti d'accordo delle differenze sono contenuti con differenze statisticamente non significative
P14 50-100			Si	
P12 50-100			Si	
P10 50-100			Si	

Tab.16- Validazione risultati per Cadmio. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

Cd - L2=0,8			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200			SI	
P2 50-100				
P8 150-200				
P3 50-100				
P14 50-100				
P12 50-100				
P10 50-100				

Tab.17- Validazione risultati per Cromo. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

Cr - L2=150			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200			SI	
P2 50-100				
P8 150-200				
P3 50-100				
P14 50-100				
P12 50-100				
P10 50-100				

Tab.18- Validazione risultati per Rame. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

Cu - L2=52			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200			SI	
P2 50-100				
P8 150-200				
P3 50-100				
P14 50-100				
P12 50-100				
P10 50-100				

Tab.19- Validazione risultati per Nichel. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

Ni - L2=75			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200			SI	
P2 50-100				
P8 150-200				
P3 50-100				
P14 50-100				
P12 50-100				
P10 50-100				

Tab.20- Validazione risultati per Piombo. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

Pb - L2=70			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200	46,86	76,50	Si	i limiti d'accordo delle differenze sono contenuti con differenze statisticamente non significative
P2 50-100			Si	
P8 150-200			Si	
P3 50-100			Si	
P14 50-100			Si	
P12 50-100			Si	
P10 50-100			Si	

Tab.21- Validazione risultati per Zinco. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

Zn - L2=150			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200	159,12	149,03	Si	i limiti d'accordo delle differenze sono contenuti con differenze statisticamente non significative
P2 50-100			Si	
P8 150-200			Si	
P3 50-100			Si	
P14 50-100			Si	
P12 50-100	113,52	165,23	Si	i limiti d'accordo delle differenze sono contenuti con differenze statisticamente non significative
P10 50-100	113,12	177,95	Si	i limiti d'accordo delle differenze sono contenuti con differenze statisticamente non significative

Tab.22- Validazione risultati per Mercurio. Sono riportati soltanto i valori oggetto di considerazione ulteriore.

Hg - L2=0,8			Validazione	note
	CIBM	ISPRA		
P9 150-200			Si	
P2 50-100			Si	
P8 150-200			Si	
P3 50-100	1,12	0,43	Si	1 valore outlier evidentemente affetto da errore grossolano
P14 50-100			Si	
P12 50-100			Si	
P10 50-100			Si	

Nella elaborazione dei risultati è emerso che il campione di sedimento P3 50-100 presenta valori del parametro Mercurio sistematicamente superiore ai valori trovati da ISPRA di circa 2 volte e circa 10 volte rispetto agli altri; si ritiene probabile che vi possa essere un errore grossolano e pertanto non è stato considerato nella elaborazione. Altri campioni presentano discordanze all'interno del range dell'incertezza che consentono quindi la validazione. Tutti i gli altri campioni sono validati già dopo la prima fase.

3.3 Analisi ecotossicologiche

Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

Nella tabella 20 sono riportati i risultati ISPRA relativi al saggio biologico con il batterio *Vibrio fischeri* condotto sugli elutriati preparati dai sedimenti prelevati nelle stazioni di campionamento.

In tabella 21 i risultati del saggio biologico con il batterio *Vibrio fischeri* del CIBM.

Tab. 20 - Risultati del saggio sviluppo con *V. fischeri*-*Ispra*

Campione	Incubaz.	EC ₂₀ -EC ₅₀ (%)	R ²	Fattore di correzione	Massimo Effetto (%)	Media ± d.s. (%)	Tossicità
P2 50-200	5'	>90	-	-	2,65	2,193 ± 0,681	Assente
	15'	>90	-	-	1,41		
	30'	>90	-	-	2,52		
P7 50-200	5'	>90	-	-	2,46	2,043 ± 0,363	Assente
	15'	>90	-	-	1,87		
	30'	>90	-	-	1,80		
P8 50-200	5'	>90	-	-	3,48	2,973 ± 0,776	Assente
	15'	>90	-	-	2,08		
	30'	>90	-	-	3,36		
P13 50-200	5'	>90	-	-	1,69	1,407 ± 0,347	Assente
	15'	>90	-	-	1,51		
	30'	>90	-	-	1,02		

Tutti i campioni sono risultati privi di tossicità.

 Tab. 21 - Risultati del saggio sviluppo con *V. fischeri* CIBM

Campione	pH	Salinità (‰)	%Effetto (15')	%Effetto (30')	EC20 (30')	EC50 (30')	Tossicità
P2/50-200	7,93	38	-14,18	-12,69	>90	>90	Assente
P7/50-200	8,07	38	-14,04	-10,52	>90	>90	Assente
P8/50-200	8,18	38	-10,25	-7,25	>90	>90	Assente
P13/50-200	8,08	38	-9,83		>90	>90	Assente

I risultati dei 4 campioni risultano privi di tossicità per entrambe le prove.

3.4 Saggio biologico con *Paracentrotus lividus*

Nelle Tabelle 22 e 23 sono riportati i risultati ISPRA del saggio di spermiossicità e quello di embriossicità con i gameti di *Paracentrotus lividus* condotto sugli elutriati preparati dai sedimenti prelevati nelle stazioni di campionamento.

Le classi di tossicità attribuite ai campioni analizzati sono state ottenute alla luce della recente modifica normativa apportata dal D.Lgs. n.173 del 15 Luglio 2016.

Tab. 22 - Risultati del saggio di spermiossità con *P. lividus* - ISPRA

CAMPIONE	CONC.	% media di uova fecondate	Dev. Stan	Media Non Fecondati	Dev. Stan	Corr. Abbott	EC20 EC50	Tossicità
SW	-	87,67	0,58	12	0,58	0	-	-
P2/50-200	100	84,00	1,00	16	1,00	4	>90	Assente
	50	84,33	1,53	16	1,53	4		
	25	85,67	0,58	14	0,58	2		
P7/50-200	100	84,00	1,00	16	1,00	4	>90	Assente
	50	85,00	1,00	15	1,00	3		
	25	85,00	1,00	15	1,00	3		
P8/50-200	100	83,67	1,53	16	1,53	5	>90	Assente
	50	84,67	1,15	15	1,15	3		
	25	86,00	1,00	14	1,00	2		
P13/50-200	100	83,33	1,15	17	1,15	5	>90	Assente
	50	84,00	1,00	16	1,00	4		
	25	85,33	1,15	15	1,15	3		

EC50 (Cu (NO3)2) [$\mu\text{g l}^{-1}$]	46,81
UL	50,84
LL	42,06

In tabella 23, i risultati del saggio di spermiossità con i gameti di *Paracentrotus lividus* del CIBM.

 Tab. 23 - Risultati del saggio di spermiossità con *P. lividus* - CIBM

Campione	Conc. Elutriato (%)	% media di uova fecondate	dev.st	% media di uova non fecondate	Correzione Abbott % uova non fecondate	EC 20 (%)	EC 50 (%)	Tossicità
CONT	-	82	$\pm 2,00$	18	0	-	-	-
P2/50-200	100	74	$\pm 0,58$	26	10	>90	>100	Assente
	50	80	$\pm 1,15$	20	3			
	25	81	$\pm 1,15$	19	1			
P7/50-200	100	72	$\pm 1,73$	28	12	>90	>100	Assente
	50	77	$\pm 1,73$	23	6			
	25	81	$\pm 0,58$	19	1			
P8/50-200	100	64	$\pm 1,73$	36	22	87,4	>100	Bassa
	50	72	$\pm 1,73$	28	13			
	25	80	$\pm 1,73$	20	2			
P13/50-200	100	60	$\pm 1,15$	40	27	71,9	>100	Bassa
	50	70	$\pm 1,15$	30	14			
	25	81	$\pm 1,15$	19	2			

EC50 (Cu) [$\mu\text{g l}^{-1}$]	36,21
UC	38,63
LC	33,63

Si evidenzia una leggera differenza tra i due risultati rispetto alla presenza di una tossicità “bassa”, nei campioni P8/50-200 e P13/50-200 nel caso dei risultati CIBM, rispetto ad una tossicità “assente” degli stessi campioni analizzati da ISPRA. Tale differenza trova una qualche giustificazione nel fatto che:

1) il controllo negativo presenta una media fecondati che seppure superiore all’80% (quindi accettabile per i nostri standard) risulta evidentemente più bassa rispetto al controllo negativo di ISPRA. La bassa tossicità dei campioni riscontrata da CIBM (in particolare il campione P8), probabilmente non sarebbe stata evidenziata se la % media fecondati fosse stata superiore o pari all’85% come per ISPRA.

2) i valori di EC50 riportati per il tossico di riferimento, seppure in accordo con la letteratura scientifica che riporta valori per il rame che oscillano da 20 a 110 µg/L, sono sensibilmente più bassi rispetto al controllo positivo di ISPRA e quindi la maggiore sensibilità dei gameti può aver inficiato il calcolo della tossicità nei campioni P8 e P13.

3.5 Saggio biologico con *Corophium orientale*

Nella Tabella 24 sono riportati i risultati del saggio di mortalità a 10 giorni con l’anfipode *Corophium orientale* condotto sui sedimenti prelevati nelle stazioni di campionamento.

Tab. 24 - Risultati del saggio di mortalità con *C. orientale*- ISPRA

Campione	% Mortalità	Dev. St.	% Mortalità corretta con Abbott	Giudizio tossicità
CONT CIBM	6,00	1,00	-	
P2/50-200	3,00	0,50	-3	Assente
P7/50-200	9,00	3,20	3	Assente
P8/50-200	10,00	1,91	4	Assente
P13/50-200	1,00	0,50	-5	Assente

LC50	2,96
UL	3,80
LL	2,30

I parametri salinità, T, pH e %O di ogni campione, rilevati all’inizio e alla fine del saggio, risultano congrui con quelli suggeriti dal protocollo “ISO 2005. Water Quality - Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediments to amphipods”.

La sensibilità degli animali impiegata è stata valutata calcolando il valore dell’LC50 utilizzando il Cd(NO3)2·4H2O come sostanza tossica di riferimento. Il valore di LC50 di 2,96 mg/l (limite superiore e inferiore 3,80 – 2,30) ottenuto risulta in accordo con quanto riportato in letteratura per questa specie e cade nell’intervallo della carta di controllo del laboratorio (LC50 a 96 h compreso nell’intervallo 0,6 ÷

Riguardo il confronto tra le analisi effettuate (granulometria, analisi metalli e saggi biologici), i dati riportati da CIBM risultano del tutto confrontabili con quelli eseguiti da ISPRA.