

Appendice 3: Saggi di ecotossicità per la determinazione della qualità delle acque marine nell'area antistante la Centrale A2A Energiefuture di San Filippo del Mela

RELAZIONE TECNICA

SAGGI DI ECOTOSSICITA' PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DELL'ACQUA DI MARE NELL'AREA DI SCARICO DELLA CENTRALE IN SAN FILIPPO DEL MELA

Committente

TAUW Italia S.r.l.
Galleria Giovan Battista Gerace
14,
56124 Pisa
Italia

Laboratorio Incaricato

ChemService S.r.l. Controlli e
Ricerche
Via F.lli Beltrami 15,
20026 Novate Milanese (MI)
Italia

Laboratorio che ha eseguito le analisi

CIBM - Consorzio per il Centro
Interuniversitario di Biologia
Marina ed Ecologia Applicata "G.
Bacci"
Viale Nazario Sauro 4,
57128 Livorno
Italia

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'obiettivo del progetto è stata la caratterizzazione ecotossicologica dell'acqua di mare antistante la Centrale A2A Energiefuture di San Filippo del Mela, che costituisce il corpo recettore degli scarichi idrici della Centrale nella configurazione attuale autorizzata, e in quella futura, a seguito della realizzazione del progetto. Per effettuare l'indagine ecotossicologica, l'acqua di mare è stata campionata in tre punti a circa 100 m dalla riva, come dettagliato nella figura 1: con questi punti sarà possibile verificare in futuro mediante gli stessi test ecotossicologici l'eventuale incidenza della Centrale sull'acqua di mare a valle della realizzazione del progetto. Sui tre campioni è stata eseguita una batteria di ecotest rappresentativi di diversi livelli trofici. Gli studi di ecotossicità sono stati svolti sull'alga marina unicellulare *Phaeodactylum tricornutum* (per la valutazione degli effetti ecotossici cronici), sul crostaceo marino *Acartia tonsa* (per la valutazione degli effetti ecotossici acuti) e su gameti di riccio di mare *Paracentrotus lividus* (per la valutazione degli effetti ecotossici acuti).

IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Le specifiche dei campioni analizzati sono riportate nella seguente tabella:

Codice CIBM	Codice campione	Data campionamento	Data accettazione	Rif. Interno CIBM
3154-20	ECOTOX 1	11/11/2020	13/11/2020	S.A. 131-20
3158-20	ECOTOX 2	11/11/2020	13/11/2020	S.A. 131-20
3159-20	ECOTOX 3	11/11/2020	13/11/2020	S.A. 131-20

Il prelievo dei campioni è stato effettuato a centrale attiva. I campioni sono stati trasportati in contenitore refrigerato e stoccati a 4°C all'arrivo in laboratorio fino al momento dell'analisi.

PUNTI DI CAMPIONAMENTO



Figura 1 - Immagine punti di prelievo

MATERIALI e METODI

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche dei campioni di acqua prelevati, prima dell'esposizione degli organismi.

Tabella 1: Parametri chimico fisici: Salinità, pH e ossigeno disciolto

Sigla campione	Salinità (‰)	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
ECOTOX 1	38	8,18	6,35
ECOTOX 2	38	8,18	6,02
ECOTOX 3	38	8,22	6,13

Metodiche impiegate per i saggi

Saggio di inibizione della crescita con alghe unicellulari (*Phaeodactylum tricornutum*) a 72 h: - ISO 10253:2016 ceppo di *P. tricornutum* (ceppo CCAP 1052/1A). Tossico di riferimento: dicromato di potassio. Il valore di EC₅₀ registrato con il tossico di riferimento pari a 3,13 mg/L (2,98 - 3,28), rientra all'interno dei valori di EC₅₀ della carta di controllo del laboratorio (1,94 - 4,36 mg/l).

Saggio di immobilizzazione con *Acartia tonsa* a 48 ore: UNICHIM 2365- utilizzate uova di *A. tonsa* raccolte entro le 72 ore dall'allestimento del test da ceppo di laboratorio. Tossico di riferimento: Ni²⁺. Il valore di EC₅₀ del numero di sopravvissuti registrato con il tossico di riferimento è pari a 0,054 mg/L (0,042-0,072).

Saggio di fecondazione con *Paracentrotus lividus*. EPA/600/R-95-136/Sezione16. Tossico di riferimento: Cu². I valori di EC₅₀ registrati con il tossico di riferimento risultano pari a 36,74 µg/L (34,79-38,80) e rientrano all'interno dei valori di EC₅₀ della carta di controllo del laboratorio (20,48 - 40,93 µg/L).

RISULTATI

Saggio di inibizione della crescita con alghe unicellulari (*Phaeodactylum tricornutum*) 72 h

Nella tabella 2 sono mostrati i risultati relativi al test di inibizione della crescita di alghe unicellulari eseguito su campioni diluiti al fine di abbassarne la salinità entro il limite superiore del range previsto (26-34), la concentrazione massima testata è stata dell'80%.

Nella tabella 3 sono mostrati i risultati relativi al test di inibizione della crescita di alghe unicellulari eseguito su campioni tal quali, in questo caso anche il controllo è stato portato ad una salinità simile a quella misurata nei campioni.

Entrambi i test sono risultati validi secondo i limiti di accettabilità del test riportati nella nota in calce alla tabella. I valori di EC50 con il tossico di riferimento rientrano nel range della carta di controllo del laboratorio.

Per quanto riguarda il test di inibizione della crescita algale sono riportati in tabella 2 i risultati osservati alla massima concentrazione testata (80%); non è stato possibile calcolare valori di EC10, EC20 ed EC50, ad eccezione del campione ECOTOX 3, per il quale è stato possibile calcolare un valore di EC10 pari a 49,78 % (37,09-66,04). Tuttavia, ripetendo il test utilizzando i campioni tal quali come da tabella 3 (concentrazione massima testata 100%), si osserva una biostimolazione significativamente differente dal controllo (test ANOVA seguito da post-test di Dunnett per la comparazione con il controllo, figura 2).

Tabella 2: test con alghe (*P. tricornutum*) a 72 h eseguito su campioni diluiti (max conc. testata 80%)

Campione	Media n. cellule/mL ± deviazione standard		ΔG (%)
Controllo	1100000	± 26458	-
ECOTOX 1	1013333	± 30551	-7,88
ECOTOX 2	1103333	± 55076	0,30
ECOTOX 3	943333	± 49329	-14,24

ΔG: incremento o inibizione della crescita rispetto al controllo

Tabella 3: test con alghe (*P. tricornutum*) a 72 h eseguito su campioni tal quali

Campione	Media n. cellule/mL ± deviazione standard		ΔG (%)
Controllo	443333	± 25166	-
ECOTOX 1	493333	± 5774	11,28
ECOTOX 2	490000	± 10000	10,53
ECOTOX 3	526667	± 30551	18,80

ΔG: incremento o inibizione della crescita rispetto al controllo

I risultati di entrambi i test (su campioni diluiti e tal quali) sono stati riportati in grafici rappresentanti curve concentrazione-risposta. Le medie del numero di cellule osservate alle diverse concentrazioni sono state confrontate mediante un'analisi ANOVA seguita da un post-test di Dunnett per la comparazione con il controllo. La figura 2a mostra una NOEC per il campione ECOTOX 1 pari al 40%, la figura 2b mostra una NOEC per il campione ECOTOX 2 pari all'80%, mentre la figura 2c mostra una NOEC per il campione ECOTOX 3 pari al 20%.

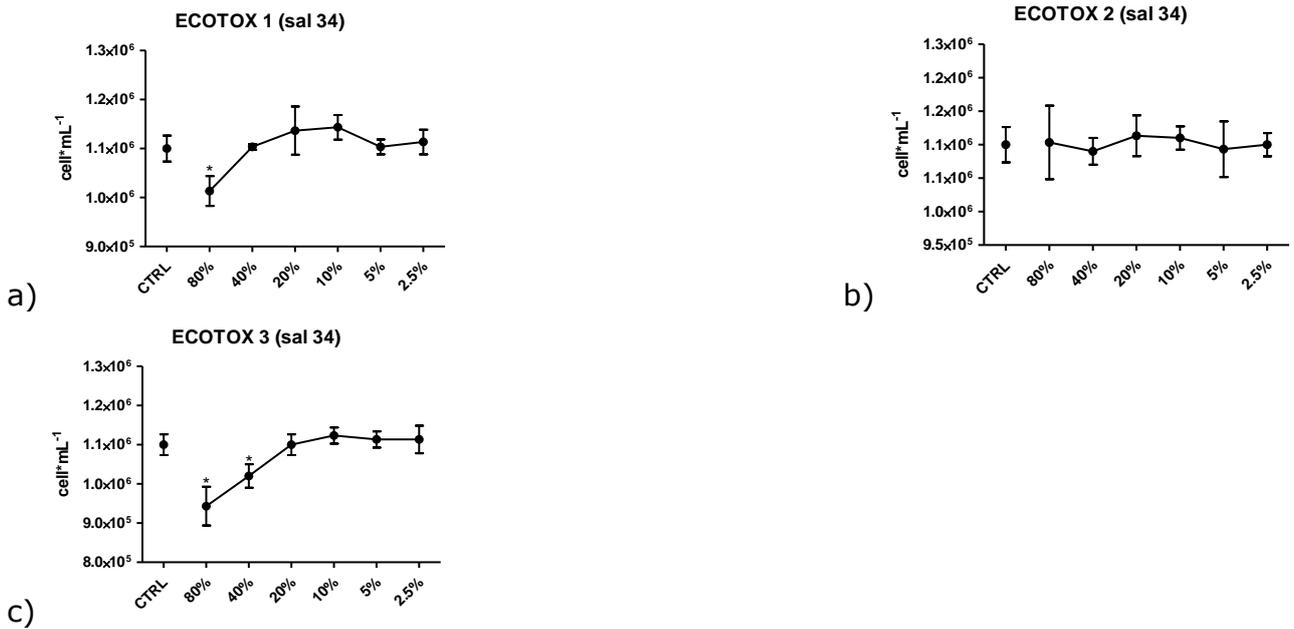


Figura 2 (a-b-c): curve concentrazione-risposta ottenute dal saggio di inibizione della crescita algale su *P. tricornutum* eseguito su campioni diluiti. *= statisticamente diverso dal controllo (CTRL), $p < 0.05$

Osservando la figura 2 ed il numero di cellule nei controlli riportate nelle tabelle 2 e 3, è possibile osservare come l'elevata salinità dei campioni e del controllo (>35) si traduca principalmente in una riduzione generalizzata della crescita algale. In questo test ciò che si è potuto osservare è stato un trend opposto a quello osservato sui campioni diluiti; infatti, non si è in nessun caso osservata un'inibizione della crescita, bensì una stimolazione della stessa. Tale stimolazione, ai fini della valutazione della tossicità, non risulta significativa (<20%). Ai fini dell'individuazione della NOEC, intesa in questo caso relativa all'endpoint "stimolazione", è stato eseguito (come descritto in precedenza) un test ANOVA. Le figure 3a e 3b mostrano valori di NOEC non calcolabili per entrambi i campioni ECOTOX 1 ed ECOTOX 2, mentre la figura 3c mostra una NOEC per il campione ECOTOX 3 pari al 50%.

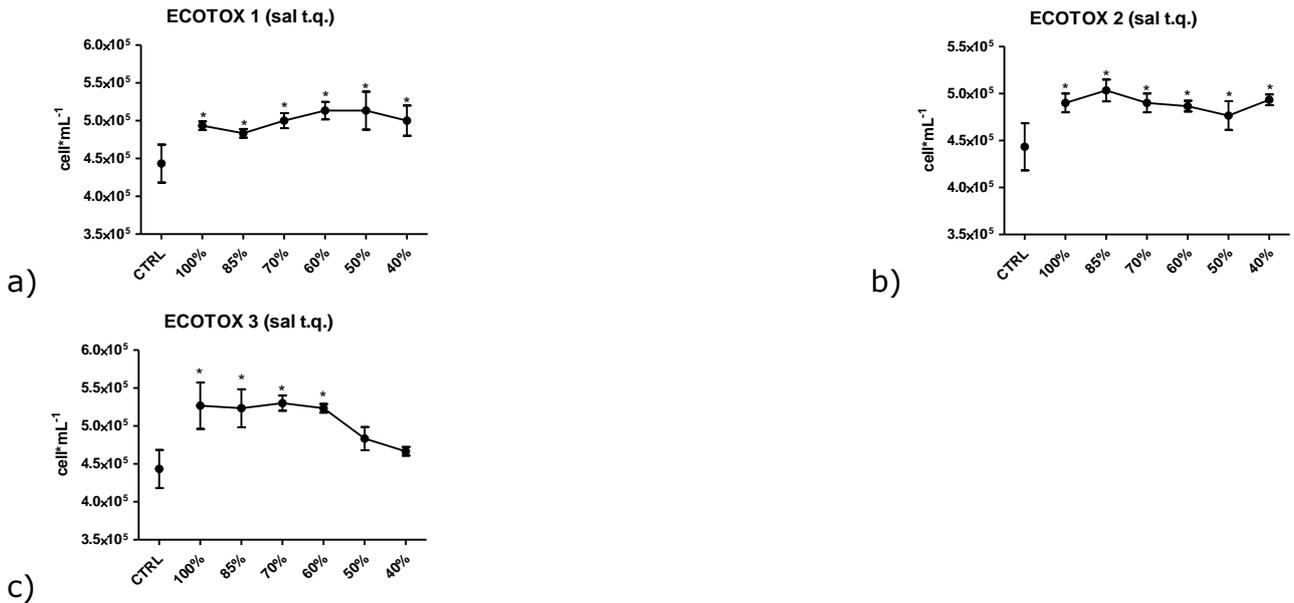


Figura 3 (a-b-c): curve concentrazione-risposta ottenute dal saggio di inibizione della crescita algale su *P. tricornutum* eseguito su campioni tal quali. *= statisticamente diverso dal controllo (CTRL), $p < 0.05$

Note: sono riportati in tabella la media \pm deviazione standard del numero di cellule/ml (media da n. 3 singole repliche) calcolato attraverso conta spettrofotometrica. Il controllo è costituito dal mezzo di coltura utilizzato per la preparazione dell'elutriato. ΔG : incremento o inibizione della crescita rispetto al controllo. Limite di accettabilità del saggio: il numero di cellule del controllo deve essere almeno 16 volte superiore (fattore 16) rispetto all'inoculo di cellule iniziale (10000 cellule/ml).

Saggio di immobilizzazione con *Acartia tonsa* a 24 e 48 ore

Nelle tabelle 4 e 5 sono mostrati i risultati relativi al saggio di immobilizzazione con *A. tonsa*. Il test è risultato valido secondo i limiti di accettabilità del test riportati nella nota in calce alla tabella. Non si osservano effetti di tossicità acuta, in termini di immobilizzazione dei naupli, rispetto al controllo in nessuno dei campioni testati. La massima concentrazione testata è stata del 70% a causa dei limiti di salinità previsti per una corretta schiusa delle uova (30 ± 2). Tutti e tre i campioni testati non hanno mostrato percentuali di mortalità significativamente maggiori del controllo sia a 24 che a 48 ore di esposizione indicando un'assenza di tossicità al di sotto del 70% di concentrazione. Dati i risultati ottenuti non è stato possibile calcolare valori di EC10/20/50.

Tabella 4: test con copepodi (*A. tonsa*) a 24 h eseguito su campioni diluiti (max conc. testata 70%)

Campione Max. Conc.	Sopravvivenza media (\pm dev. st. %)			Mortalità media (\pm dev.st. %)		
Controllo metodologico	92	\pm	0,52	8	\pm	0,52
ECOTOX 1	96	\pm	0,41	4	\pm	0,41
ECOTOX 2	100	\pm	0,41	0	\pm	0,41
ECOTOX 3	100	\pm	0,00	0	\pm	0,00

Tabella 5: test con copepodi (*A. tonsa*) a 48 h eseguito su campioni diluiti (max conc. testata 70%)

Campione Max. Conc.	Sopravvivenza media (\pm dev. st. %)			Mortalità media (\pm dev.st. %)		
Controllo metodologico	88	\pm	0,55	12	\pm	0,55
ECOTOX 1	92	\pm	0,52	8	\pm	0,52
ECOTOX 2	92	\pm	0,41	4	\pm	0,41
ECOTOX 3	88	\pm	0,52	12	\pm	0,52

Note: Limiti di accettabilità del saggio: nel controllo la % di immobilizzazione dei naupli introdotte deve essere < 20%.

Saggio di fecondazione con *Paracentrotus lividus*

La tabella 6 riporta i risultati relativi al saggio di fecondazione con *P. lividus*. Il test è risultato valido secondo i limiti di accettabilità del test riportati nella nota in calce alla tabella. I valori di EC50 con il tossico di riferimento rientrano nel range della carta di controllo del laboratorio. Su tutti e tre i campioni non è stato possibile calcolare un valore di EC50. Tuttavia, i campioni ECOTOX 2 ed ECOTOX 3 hanno mostrato valori di EC20 calcolabili (83,20% e 87,3%, rispettivamente), evidenziando quindi una bassa tossicità. Il campione ECOTOX 1 non ha evidenziato tossicità.

Campione	Conc. %	% uova fecondate (\pm dev.st. %)		% uova non fecondate	Corr. ABBOTT (uova non fecondate)	EC20 (%)	EC50 (%)
Controllo metodologico	-	87	\pm 1,53	13	0	-	-
ECOTOX 1	100	79	\pm 1,00	38	10	≥ 90	≥ 100
	50	83	\pm 1,53	27	5		
	25	86	\pm 1,00	16	2		
ECOTOX 2	100	66	\pm 0,58	100	25	83,20	≥ 100
	50	79	\pm 1,53	100	10		
	25	85	\pm 1,53	87	3		
ECOTOX 3	100	68	\pm 1,53	21	23	87,3	≥ 100
	50	78	\pm 1,53	17	11		
	25	85	\pm 0,58	14	3		

Note: sono riportate in tabella le percentuali medie di uova fecondate \pm D.S. e di uova non fecondate, sia tal quali sia a seguito di correzione di Abbott per la normalizzazione sul controllo. Limite di accettabilità del saggio: la % di fecondazione nel controllo deve essere compresa tra il 75% e il 95%.

CONCLUSIONI

I saggi biologici effettuati sui campioni selezionati non mostrano criticità ecotossicologiche alla massima concentrazione (100%), dove possibile, o a diluizioni della stessa. Soltanto i campioni ECOTOX 2 ed ECOTOX 3 hanno mostrato un basso effetto sulla capacità di fecondazione di spermatozoi di *P. lividus* a seguito dell'esposizione; tale effetto però rientra nei valori di controllo dopo aver diluito il campione in base 2 (e cioè con elutriato diluito al 50%) come previsto dalla letteratura per tale specie data la sua estrema sensibilità e quindi il rischio di sovrastima della tossicità.



Maria Chiara Neri
Operations Manager
Chemservice Srl

ChemService S.r.l.
Controlli e Ricerche
Via F.lli Beltrami, 15 - 20026 Novate M.se