

Allegato 4: Saggi di ecotossicità per la determinazione della qualità delle acque marine e del suolo nei pressi della Centrale Termoelettrica ERG Power di Priolo Gargallo (SR)

RELAZIONE TECNICA

SAGGI DI ECOTOSSICITÀ PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DELLE ACQUE MARINE E DEL SUOLO NEI PRESSI DELLA CENTRALE TERMOELETTRICA ERG POWER DI PRIOLO GARGALLO (SR)

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 Incaricato delle analisi su acqua marina
Consorzio per il Centro Interuniversitario di Biologia
Marina ed Ecologia Applicata "G. BACCI"
CIBM

SOMMARIO

OBIETTIVO DEL PROGETTO	3
IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI.....	3
PUNTI DI CAMPIONAMENTO.....	4
LINEE GUIDA E METODI UTILIZZATI	5
DEFINIZIONI	5
SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SU CAMPIONE DI SUOLO	6
Saggio di tossicità acuta su <i>Daphnia magna</i>	6
Principio del metodo	6
Composizione del mezzo acquoso	6
Preparazione dell'elutriato	7
Risultati.....	7
Saggio di tossicità acuta su <i>Eisenia foetida</i>	9
Principio del metodo	9
Composizione del suolo artificiale.....	9
Risultati.....	10
SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SU CAMPIONI ACQUA MARINA	11
Saggio di inibizione della crescita con alghe unicellulari (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>).....	11
Metodica impiegata.....	11
Risultati.....	11
Saggio di immobilizzazione con <i>Acartia tonsa</i>	12
Metodica impiegata.....	12
Risultati.....	12
Saggio di inibizione della bioluminescenza con <i>Vibrio fischeri</i>	13
Metodica impiegata.....	13
Risultati.....	13
CONCLUSIONI.....	14

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'obiettivo del progetto è stata la caratterizzazione ecotossicologica del suolo e delle acque presenti nelle immediate vicinanze della Centrale termoelettrica ERG Power S.r.l di Priolo Gargallo (SR).

Per effettuare l'indagine ecotossicologica sono stati prelevati due campioni di acqua marina in due punti localizzati uno a nord ed uno a sud dei corsi d'acqua artificiali Vallone della Neve e Canale 24 che recapitano a mare gli scarichi idrici della Centrale ed un campione di suolo in un'area nelle vicinanze della Centrale.

Sul campione di suolo si è valutato l'impatto sugli organismi terrestri e i possibili effetti della lisciviazione del suolo sugli organismi acquatici. A questo scopo è stato svolto uno studio di tossicità sul verme *Eisenia foetida* (per la valutazione degli effetti tossici acuti sul comparto terrestre) ed uno studio sul crostaceo cladocero *Daphnia magna* Strauss (per la valutazione degli effetti tossici acuti sul comparto acqua (elutriato)).

Su entrambi i campioni di acqua è stata eseguita una batteria di ecotest acuti/cronici rappresentativi di diversi livelli trofici. Gli studi di ecotossicità sui campioni di acqua marina sono stati svolti sull'alga marina unicellulare *Phaeodactylum tricornutum* (effetto cronico), sul crostaceo marino *Acartia tonsa* (effetto acuto) e sul batterio *Vibrio fischeri* (effetto acuto).

IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Identificazione campione	Suolo	
Codice interno ChemService	2106560-001	
Data di ricevimento in laboratorio	05/10/2021	
Quantità	~20 kg	
Contenitore	Sacco	

Identificazione campione	Acqua marina	
Codice Interno CIBM	3785-21	3786-21
Codice campione	0260378 - ISAB SUPER PONTILE P2	0260379 - ISAB PONTILE LIQUIDI P1
Data di ricevimento in laboratorio	07/10/2021	07/10/2021
Rif. Interno CIBM	S.A. 110-21	S.A. 110-21

PUNTI DI CAMPIONAMENTO



Figura 1: Punti di campionamento acqua marina e suolo presso la centrale termoelettrica ERG POWER di Priolo Gargallo (in rosso i confini delle aree di pertinenza ERG Power)



(2)



(3)

Figure 2 e 3: Dettaglio punti di campionamento del suolo e delle acque marine presso la centrale termoelettrica ERG POWER di Priolo Gargallo

LINEE GUIDA E METODI UTILIZZATI

- OECD No. 202, 2004 - “*Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test”
- APAT CNR IRSA 8020 b man 29 2003 “Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*”
- UNI EN ISO 6341:2004 “Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)”.
- OECD No. 207, 1984: Earthworm, Acute Toxicity Tests
- UNI EN 12457-2:2004: Characterisation of waste; Leaching – Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges.
- Qualità dell'acqua - Saggio di inibizione della crescita delle alghe marine *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornerutum* - ISO 10253:2016
- Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di naupli di *Acartia tonsa* Dana (Crustacea: Copepoda) dopo 24 h e 48 h di esposizione - UNICHIM 2365:2012
- Saggio di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri* - ISO 11348-3:2007/Amd 1:2018

DEFINIZIONI

- TQ:** campione tal quale (acqua o suolo non diluito).
- Controllo negativo:** gruppo di organismi non esposti al campione da testare, ma mantenuti in un terreno standard (acqua o suolo) che ne garantisca la buona salute.
- LOEC:** la più bassa concentrazione saggiata alla quale il campione dà un effetto avverso sugli organismi esposti durante il test.
- NOEC:** la più alta concentrazione saggiata alla quale il campione non dà effetti avversi sugli organismi esposti durante il test.
- EC_{20/50}:** la concentrazione calcolata di sostanza test che causa l'effetto tossico sul 20% o 50% degli organismi esposti.
- LC₅₀:** la concentrazione calcolata di sostanza test che causa la morte del 50% degli organismi esposti.

SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SU CAMPIONE DI SUOLO

Sul campione di suolo sono stati condotti studi di ecotossicità su:

- crostaceo cladocero *Daphnia magna* Strauss (elutriato)
- verme di terra *Eisenia foetida*

Saggio di tossicità acuta su *Daphnia magna*

Principio del metodo

Il test di tossicità acuta su *Daphnia magna* dell'elutriato è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD 202 "*Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test.", utilizzando organismi provenienti dall'allevamento interno al laboratorio, acquistati originariamente da MicroBioTests Inc., con sede in Belgio nel dicembre del 2011 (numero di batch: DM290911).

Sono stati preparati quattro beacker contenenti il campione tal quale da testare (TQ) e quattro beacker contenenti la sola acqua ricostituita (controllo negativo). In ogni beacker sono stati introdotti 5 dafnidi di età inferiore a 24 ore.

I beacker così preparati sono stati incubati in condizioni controllate all'interno di una camera climatica.

Dopo 24 e dopo 48 ore dall'inizio dell'esposizione, è stata registrata l'immobilizzazione (vengono definiti immobili gli organismi che non sono in grado di muoversi entro 15 secondi dopo leggera agitazione).

Durata dello studio:	48 ore
Fotoperiodo:	16 ore di luce / 8 ore di buio
Intensità luminosa:	tra 1000 e 1500 Lux
Temperatura:	tra 18 e 22 °C (conforme al range raccomandato dalla OECD 202, 2004)

Composizione del mezzo acquoso

Per la preparazione del controllo negativo è stata utilizzata acqua ricostituita preparata in accordo alla linea guida OECD 202, 2004:

<u>Composizione</u>	<u>Concentrazione finale</u>
CaCl ₂ 2H ₂ O	294.0 mg/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	123.3 mg/L
NaHCO ₃	64.8 mg/L
KCl	5.8 mg/L

Preparazione dell'elutriato

La preparazione dell'elutriato è stata effettuata utilizzando il metodo descritto nella UNI EN 12457-2 "UNI EN 12457-2:2004: Characterisation of waste; Leaching – Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges".

Il contenuto di umidità presente all'interno del suolo è stato determinato tramite essiccamento di un'aliquota di campione per 24 ore a 105°C (umidità pari a 22.0% del peso secco).

L'elutriato è stato preparato trasferendo un'aliquota di 109.8 g di suolo (equivalente a 0.090 kg di campione secco) setacciato a < 4mm di diametro all'interno di una bottiglia di vetro insieme a 880 mL di acqua deionizzata (corrispondente ad un rapporto L/S pari a 10 L/kg).

La bottiglia è stata posta in agitazione all'interno di un miscelatore a rovesciamento settato a 10 giri al minuto per 24 ore.

Al termine dell'agitazione si è lasciata sedimentare la sospensione per 20 minuti prima di separare la fase liquida da quella solida.

Il campione è stato posto in centrifuga per 10 minuti a 80000 rpm per permettere una migliore separazione delle due fasi e successivamente filtrato con filtri 0,45 µm.

La soluzione risultante appariva limpida e presentava una colorazione marrone.

Risultati

Il saggio di tossicità su *Daphnia magna* è stato condotto sul campione tal quale (TQ) senza ricostituzione della soluzione.

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.94 – 7.38
TQ	7.76 – 7.77

(conforme al range raccomandato 6 – 9 (OECD 202, 2004)

Concentrazione di ossigeno:

Diluizione del campione	Valori (mg/L) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.81 – 7.08
TQ	7.50 – 7.03

(conforme al range raccomandato ≥ 3 mg/L OECD 202, 2004)

Criteri di validità del test:

*Nel controllo negativo l'immobilizzazione delle dafnie non deve superare il 10%

*Il pH non deve variare più di 1.5 unità al termine del test

*La concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere ≥ 3 mg/l alla fine del saggio

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Risultati biologici: Immobilizzazione

Tempo di esposizione (h)	Campione	Organismi esposti	Organismi immobilizzati	Percentuale di immobilizzazione (%)
24	Controllo neg.	20	0	0
	TQ	20	0	0
48	Controllo neg.	20	0	0
	TQ	20	0	0

NOTA: dopo 48 ore di esposizione la soluzione appariva leggermente torbida con un colore tendente al marrone.

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente mediante software CETIS v. 1.8.7.7 al fine di determinare i valori di NOEC/LOEC e EC₅₀.

Analisi statistica dei risultati dell'endpoint: Immobilizzazione

Valore ricercato	Diluita – percentuale di campione
NOEC	TQ – 100%
LOEC	>TQ – >100%
EC ₅₀	>TQ - >100%

NOEC = concentrazione di non effetto

LOEC = la più bassa concentrazione ad avere un effetto sugli organismi

EC₅₀ = la concentrazione calcolata di sostanza test che causa l'immobilizzazione del 50% degli organismi esposti.

Saggio di tossicità acuta su *Eisenia foetida*

Principio del metodo

Il test di tossicità acuta su *Eisenia foetida* è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD 207, utilizzando organismi provenienti da Bias Labs Ltd.

24 ore prima dell'inizio del test i vermi sono stati trasferiti nello stesso terreno utilizzato come controllo negativo del test al fine di permetterne l'acclimatazione.

Per lo svolgimento del saggio sono state preparate quattro repliche contenenti il campione tal quale di suolo (TQ) e quattro repliche contenenti il solo terreno artificiale (controllo negativo).

L'umidità del terreno (H) del controllo negativo e del terreno TQ è stata corretta fino a circa il 35% del peso secco aggiungendo acqua deionizzata come richiesto dalla linea guida OECD 207,1984.

Ogni replica era costituita da un contenitore di vetro contenente circa 750 g di terreno (controllo negativo o campione) e 10 organismi con peso compreso tra 0,3 g e 0,6 g.

I contenitori così preparati sono stati incubati in condizioni controllate all'interno di una camera climatica. Dopo 14 giorni dall'inizio dell'esposizione, è stata registrata la mortalità.

Durata dello studio:	14 giorni
Fotoperiodo:	24 ore di luce
Intensità luminosa:	tra 400 e 800 Lux
Temperature dello studio:	20 ± 2°C; (conforme al range raccomandato dalla OECD 207,1984)

Composizione del suolo artificiale

Il terreno artificiale per la preparazione del controllo negativo è stato costituito come descritto nella linea guida OECD 207,1984:

- 10% torba di sfagno (pH 3,5 - 4,5);
- 20% caolino;
- 70% sabbia silicea essiccata a granulometria fine.

I componenti sono stati seccati utilizzando una stufa a 105 °C e poi uniti nelle corrette proporzioni. Per miscelare il terreno artificiale è stato utilizzato il miscelatore BakerMix 80. Alla miscela di terreno artificiale è stata aggiunta un'aliquota di acqua demineralizzata in modo da ottenere un'umidità di circa 35% del peso secco.

Il campione di suolo è stato setacciato a 4 mm prima dell'utilizzo.

Risultati

Il saggio di tossicità acuta su *Eisenia foetida* è stato condotto sul campione tal quale (TQ) con aggiunta di acqua demineralizzata al fine di ottenere un'umidità del terreno di circa il 35%

pH del campione:

Tipologia di suolo	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.18 – 6.10
TQ	6.95 – 7.71

Umidità % del campione:

Tipologia di suolo	Valori (%) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	35.0 – 32.4
TQ	33.4 – 32.4

Criteri di validità del test:

Alla fine del test, la mortalità degli animali del controllo negativo non deve essere superiore al 10%.

Lo studio risulta valido in quanto il criterio di validità è stato rispettato.

Risultati biologici:

Mortalità

Tempo di esposizione (giorni)	Campione	Organismi morti / Organismi esposti				Totale morti/ Totale esposti	Percentuale di mortalità (%)
		A	B	C	D		
14	Controllo neg.	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0
	TQ	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente mediante software CETIS v. 1.8.7.7 al fine di determinare i valori di NOEC/LOEC e LC₅₀.

Analisi statistica dei risultati dell'endpoint:

Mortalità

Valore ricercato	Diluizione – percentuale di campione
NOEC	TQ – 100%
LOEC	>TQ – >100%
LC ₅₀	>TQ – >100%

NOEC = concentrazione di non effetto

LOEC = la più bassa concentrazione ad avere un effetto sugli organismi

LC₅₀ = la concentrazione calcolata di sostanza test che causa la mortalità del 50% degli organismi esposti.

SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SU CAMPIONI ACQUA MARINA

Sui campioni di acqua marina sono stati svolti i test ecotossicologici su:

- alga marina unicellulare *Phaeodactylum tricornutum*
- crostaceo marino *Acartia tonsa*
- batterio *Vibrio fischeri*

Prima dell'inizio dei test, sono stati determinati i valori di salinità, pH e ossigeno disciolto misurati sui campioni tal quali e riportati nella seguente tabella.

Sigla campione	Salinità (‰)	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
3785-21	41	8,11	6,18
3786-21	41	8,06	6,24

Tabella 1: Salinità, pH e ossigeno disciolto

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

Metodica impiegata

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 mg/L), rientra all'interno dei valori di EC₅₀ della carta di controllo del laboratorio (1,94 - 4,36 mg/L).

Risultati

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 ‰) (massima concentrazione testata = 80%). Per entrambi i campioni non è stata osservata un'inibizione significativa della crescita rispetto al controllo; pertanto, non è stato possibile calcolare valori di EC₂₀ ed EC₅₀ e la tossicità risulta assente.

Il test è risultato valido secondo i limiti di accettabilità 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.

Campione	Massima concentrazione utilizzata (%)	Media n. cellule/mL ± deviazione standard	ΔG (%)
Controllo	-	866667 ± 40415	-
3185-21	80	786667 ± 15275	-9,23
3186-21	80	980000 ± 20000	13,08

Tabella 2: test con alghe (*P. tricornutum*) a 72 h

Nota: sono riportati in tabella la media ± 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.

Limiti 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).
- Il valore di pH nel controllo non deve variare di più di 1 punto dopo le 72 ore previste di incubazione

Saggio di immobilizzazione con *Acartia tonsa*

Metodica impiegata

Saggio di immobilizzazione con *Acartia tonsa* a 48 ore: UNICHIM 2365- utilizzate uova di *A. tonsa* raccolte entro le 72 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 mg/L).

Risultati

Nelle tabelle 3 e 4 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 due 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 i valori di EC₂₀ e di EC₅₀ e pertanto la tossicità risulta assente.

Campione	Massima concentrazione utilizzata (%)	Sopravvivenza media (± dev. st. %)	Mortalità media (± dev.st. %)
Controllo metodologico		93,33 ± 0,52	6,67 ± 0,52
3185-21	70	96,67 ± 0,41	3,33 ± 0,41
3186-21	70	96,67 ± 0,41	3,33 ± 0,41

Tabella 3: test con copepodi (*A. tonsa*) a 24 h eseguito su campioni diluiti (max conc. testata 70%)

Campione	Massima concentrazione utilizzata (%)	Sopravvivenza media (\pm dev. st. %)	Mortalità media (\pm dev.st. %)
Controllo metodologico		90,00 \pm 0,55	10,00 \pm 0,55
3185-21	70	93,33 \pm 0,52	6,67 \pm 0,52
3186-21	70	90,00 \pm 0,55	10,00 \pm 0,55

Tabella 4: test con copepodi (*A. tonsa*) a 48 h

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

Saggio di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri*

Metodica impiegata

Saggio di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri*: ISO 11348-3:2007/Amd 1:2018. Tossico di riferimento: Zn²⁺. I valori di EC₅₀ registrati con il tossico di riferimento a 15 minuti di esposizione risultano pari a 7,40 mg/L (5,58 - 9,80) e rientrano all'interno dei valori di EC₅₀ della carta di controllo del laboratorio (7,28 - 12,51 mg/L).

Risultati

La tabella 5 riporta relativi al saggio di inibizione della bioluminescenza con *V. fischeri*. Il test è stato eseguito senza diluire il campione, in quanto il limite superiore di salinità che permette la sopravvivenza del batterio è 55‰. La concentrazione riportata in tabella è dovuta esclusivamente alle esigenze tecniche del test. 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 i campioni non è stato possibile calcolare un valore di EC₅₀ in quanto non hanno evidenziato un'inibizione della bioluminescenza significativa rispetto al controllo e pertanto la tossicità risulta assente.

Campione	Massima concentrazione utilizzata (%)	% inibizione bioluminescenza 15' (\pm dev.st.)	% inibizione bioluminescenza 30' (\pm dev.st.)
3185-21	90	-3,77 \pm 1,56	-3,06 \pm 2,76
3186-21	7090	-3,67 \pm 1,65	2,70 \pm 2,82

Tabella 5: inibizione della bioluminescenza con il batterio marino *Vibrio fischeri*

Limiti di accettabilità del saggio:

- il valore di fkt^(*) dopo 15 o 30 minuti di incubazione rientra nel range da 0,6 a 1,8.
- le misurazioni parallele nei campioni di controllo non si scostano dalla loro media più del 3%
- le misurazioni parallele nei campioni di prova non si scostano dalla loro media più del 3%

(*)fkt = fattore di correzione (che è misura dei cambiamenti dell'intensità dei campioni di controllo durante l'esposizione)

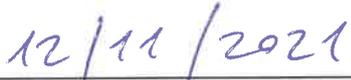
CONCLUSIONI

I risultati dei test eseguiti sui campioni di suolo e acqua marina prelevati nei pressi della Centrale termoelettrica ERG POWER di Priolo Gargallo (SR) indicano che non ci sono evidenze ecotossicologiche di tossicità relativamente alle tipologie di saggi impiegate.

Firma del tecnico



Stefano Ceriati



Data