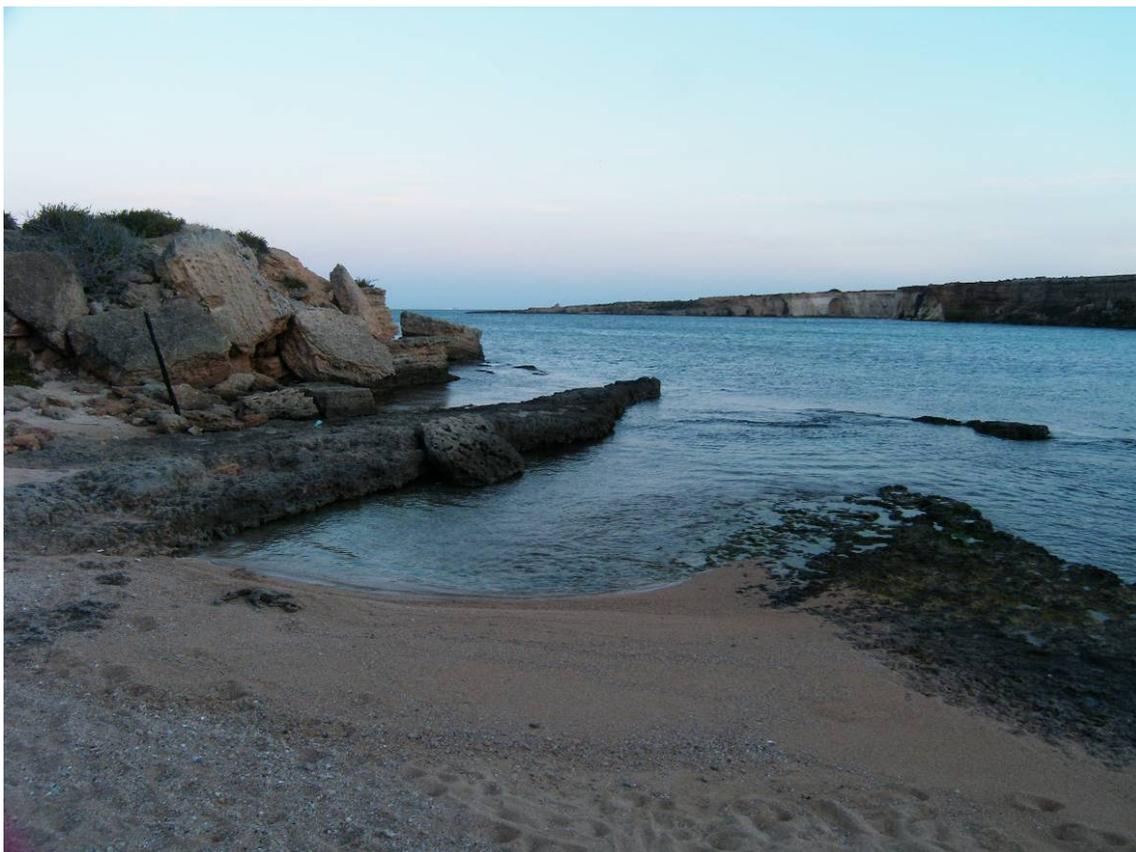




Dipartimento Tecnico ARPA EMR Sez. Prov.le di Ferrara



A cura di

Simone Modugno & Fernando Gelli

Hanno collaborato alla ricerca:

Federica Savorelli (ICRAM), Donatella Palazzi (ARPA Fe), Elena Masotti (ARPA Fe),
Annalisa Ferioli (ARPA Fe), Federico Brunelli (ARPA Fe); Pierluigi Trentini (ARPA
Fe)

Si desidera ringraziare:

Santino Zappulla (ARPA Sr), Angelo Mazzola (ARPA Sr), Daniela Conigliaro (ARPA
Sr), Dora Profeta (ARPA Sr)

**SVILUPPO ED APPLICAZIONE SPERIMENTALE DI UN SISTEMA DI
MONITORAGGIO DELLE ACQUE MARINE DELLA RADA DI PRIOLO CON
BIOSENSORI: IMPIEGO DI MOLLUSCHI E DI SPECIE ITTICHE QUALI
ORGANISMI BERSAGLIO IN TEST ECOTOSSICOLOGICI E DI
BIOCONCENTRAZIONE IN CAMPO**

8.1. Premessa

La necessità della salvaguardia dei corpi idrici dall'inquinamento rappresenta una priorità per la difesa degli ecosistemi acquatici, importanti dal punto di vista ambientale e produttivo. Un aspetto decisivo, nelle attività di controllo della qualità delle acque, è il rilevamento rapido della presenza di eventuali sostanze inquinanti e di tutte quelle possibili variazioni di natura dell'acqua che possono avere effetti indesiderati sul biota, costituendo quindi un rischio per l'intero ecosistema (Modugno et al., 2005; Brunelli, 2004; Gelli, 2003). Al riguardo il D.Lgs 258/00 aggiorna e modifica il D.Lgs 152/99 in merito ai parametri da considerare per il monitoraggio e la classificazione delle acque in funzione degli obiettivi di qualità ambientale. Ad integrazione delle analisi chimiche già previste per i corpi idrici superficiali, si evidenzia la necessità di individuare nuovi metodi per la valutazione degli effetti provocati sulle comunità biotiche degli ecosistemi, dalla presenza di sostanze chimiche pericolose, persistenti e bioaccumulabili. Infatti, le azioni di monitoraggio ambientale sono sempre riferite a campioni prelevati a cadenza predefinita, mentre sarebbe importante poter condurre indagini su campioni prelevati simultaneamente al verificarsi delle condizioni di criticità, perché i fenomeni di inquinamento, sia di origine antropica che naturale sono, nella maggior parte dei casi, un fatto accidentale e quindi non prevedibile.

Un sistema per il controllo delle variazioni in tempo reale è dato dal monitoraggio strumentale in continuo che però è generalmente limitato alla valutazione dei soli parametri chimico-fisici (EPA 2002; Jenner, 1989). Il recente sviluppo di sistemi per il monitoraggio biologico o Biological Early Warning Systems (BEWS), fornisce un prezioso strumento per la segnalazione in tempo reale delle situazioni di criticità (Kramer, 1991; Jenner, 1989). Tale monitoraggio viene effettuato con biosensori, strumenti che utilizzano organismi viventi per fornire informazioni sul mezzo ambiente, tramite l'interpretazione di un segnale che traduce le reazioni fisiologiche e comportamentali della specie bersaglio. Il loro utilizzo è particolarmente valido (Baldwin, 1994) nel realizzare i sistemi di preallarme biologico, i cosiddetti BEWS - Biological Early Warning System (Kramer, 1991). Lo studio di tali sistemi ha avuto completamento negli anni '90 del secolo scorso ed ha portato alla definizione dei requisiti ideali per un BEWS (ILSI, 1999). La caratteristica del monitoraggio biologico è quella di utilizzare organismi viventi come sensori, in grado di segnalare (preallarme

biologico) in tempi molto rapidi (minuti) l'insorgenza di una condizione di sofferenza o danno per l'organismo stesso.

L'apparecchiatura impiegata nella fase di sperimentazione e messa a punto è costituita da una sonda biologica Mosselmonitor® (Deltaconsult, NL), da una sonda multiparametrica (Idronaut), da reste con mitili sentinella (*Mytilus galloprovincialis* come popolazione di controllo) e da un campionatore automatico (ISCO) che permette il prelievo dell'acqua contestualmente al rilevamento della problematica ambientale rilevata dalle sonde. Per le considerazioni sopra esposte si è realizzato quindi un sistema complesso, che integri le diverse tecniche di monitoraggio, sia biologiche sia chimico-fisiche (Kramer, 1994).

8.1.1. Ecotossicologia

L'ecotossicologia, disciplina ambientale di origine recente, è stata definita nel 1969 da Truhaut, come una branca della tossicologia, derivante dall'incontro dell'ecologia (studio scientifico delle interazioni biotiche e abiotiche che determinano la distribuzione degli organismi viventi) con la tossicologia classica (studio degli effetti dannosi delle sostanze sull'uomo). Questa nuova disciplina ha come obiettivo lo studio, mediante metodo scientifico, del destino e degli effetti dei contaminanti nell'ambiente, non limitandosi solo all'osservazione ed alla descrizione dei fenomeni, ma elaborando anche previsioni (Vighi et al., 1998). L'ecotossicologia è una disciplina trasversale che si avvale, in maniera integrata, della chimica ambientale, della tossicologia e dell'ecologia:

- La chimica ambientale per studiare il movimento, il trasporto e le trasformazioni delle sostanze chimiche nell'ambiente, con approcci che non si limitano a prendere in considerazione separatamente i diversi comparti (come l'aria, l'acqua, gli organismi, i suoli ed i sedimenti), ma che cercano di avere una visione di sistema, tendenzialmente previsionale.
- La tossicologia ambientale per possedere strumenti atti alla valutazione del danno, non solo a livello dei singoli organismi e delle specie, ma anche su sistemi biologici complessi (come ad esempio le popolazioni e le comunità).
- L'ecologia per evidenziare quali sono i processi chiave che caratterizzano i diversi sistemi e le relazioni che intercorrono tra gli organismi ed il supporto non vivente che li ospita.

Il tutto al fine di produrre dei criteri scientifici ecotossicologici concepiti per stabilire fino a che punto certe modificazioni del sistema, come l'immissione di nutrienti o di sostanze tossiche, siano inefficaci o siano efficaci in maniera accettabile.

I campi d'indagine dell'ecotossicologia sono principalmente due:

- Studio sulla distribuzione degli inquinanti nell'ambiente (l'ingresso, i movimenti, l'immagazzinamento in specifici comparti ambientali, e la potenziale trasformazione).

- Studi relativi agli effetti degli inquinanti sugli organismi viventi, intendendo con questo l'alterazione di strutture o di funzioni delle popolazioni o delle comunità che possono modificare strutture o funzioni dell'ecosistema.

Dagli studi ecotossicologici ci si aspetta di ottenere, in sintesi:

- Dati per il controllo del rischio al fine della gestione ambientale.
- Risposte alle richieste sociali per la sintesi ed il rilascio di nuove molecole nell'ambiente.
- Sviluppo di principi empirici e teorici per incrementare le conoscenze sul comportamento e sugli effetti delle sostanze chimiche negli ecosistemi.

8.1.2. Saggi di tossicità

Lo scopo della sperimentazione tossicologica, nel campo dell'ecotossicologia, è quello di definire le quantità massime di sostanze potenzialmente pericolose che possono essere accettate al fine di una proteggere gli ecosistemi naturali o più in generale la biosfera nel suo complesso. La sperimentazione, però, può essere condotta solo su un numero limitato di specie e da queste poi deve essere estrapolata all'enorme numero di specie viventi conosciute. Studi tossicologici possono essere effettuati con finalità di ricerca scientifica di base (studio dei meccanismi d'azione tossica, o ricerca di relazioni tra la struttura delle molecole e la loro attività biologica), o per scopi applicativi più o meno diretti, spesso con un preciso valore legale (classificazione delle sostanze in funzione del loro effetto, o l'adempimento di norme legislative nazionali o internazionali).

I saggi ecotossicologici sono suddivisibili in due categorie:

- I saggi di tossicità acuta: questi test hanno l'obiettivo di misurare l'effetto dovuto all'esposizione di sostanze pure o di miscele, la cui durata sia compresa, di norma, tra 15 minuti e 96 ore. I risultati ricavati da tali saggi vengono poi impiegati per la valutazione degli effetti tossici dovuti a fenomeni di contaminazione temporanei o nelle classificazioni di tossicità.

- I saggi di tossicità cronica: questi test hanno l'obiettivo di calcolare una soglia di tossicità, ovvero quel livello di esposizione massimo che traccia il confine tra livelli efficaci e livelli non efficaci a tempo indeterminato. Per la misura delle risposte a lungo termine vengono dunque impiegate esposizioni lunghe, relativamente alla durata della vita delle specie in esame.

8.1.3. Saggi di tossicità acquatica

Nei saggi tossicologici acquatici l'organismo in esame assume il contaminante, che si trova in soluzione nel mezzo, attraverso la respirazione (con le branchie) o tramite la membrana cellulare dell'epidermide. Grazie a meccanismi di ripartizione e di equilibrio tra l'acqua e i comparti di assorbimento, si ha poi un progressivo aumento della concentrazione del tossico all'interno dell'organismo. Il destino del tossico, inoltre, una volta assorbito, è legato ai processi di distribuzione, metabolizzazione ed escrezione. È ovvio, quindi, quanto sia difficile poter stimare la concentrazione interna della molecola saggiata. È dunque convenzione quantificare la tossicità in termini di concentrazione della sostanza nel mezzo. In ogni tipo di saggio tossicologico è di primaria importanza che per tutta la durata del test la concentrazione della sostanza si mantenga costante nel tempo. Bisogna quindi porre attenzione alla persistenza della sostanza nel mezzo, che sarà funzione sia dei processi di trasformazione chimica, come l'idrolisi e la fotolisi, che di trasporto di massa, quale la volatilizzazione.

Esistono due diverse tecniche di esposizione nei test di tossicità acquatica:

- I saggi statici: possono essere senza rinnovamento (cioè una volta iniziati le soluzioni delle sostanze da saggiare e il mezzo dei controlli non vengono rinnovati per tutta la durata del saggio) o con rinnovamento (cioè una volta iniziati le soluzioni delle sostanze da saggiare e il mezzo dei controlli vengono rinnovati con soluzioni fresche a tempi determinati).
- I saggi a flusso continuo: in essi una soluzione concentrata della sostanza in esame viene continuamente pompata in un opportuno sistema di diluizione, e da lì all'organismo da saggiare.

Per ottenere un quadro degli effetti sugli ecosistemi acquatici, certo non esauriente, ma sotto un certo punto di vista relativamente completo, di norma si opera effettuando saggi su organismi rappresentativi dei principali anelli delle catene trofiche:

- Produttori Primari (ad esempio: microalghe).
- Consumatori Primari (ad esempio: microcrostacei planctonici).
- Consumatori Secondari (ad esempio: pesci).
- Decompositori (ad esempio: batteri).

8.1.4. Ittiotossicologia

Fra tutti gli organismi viventi utilizzabili ai fini del biomonitoraggio degli ecosistemi acquatici si distinguono, per tutta una serie di considerazioni, i pesci ossei. I pesci ossei rappresentano, infatti, i vertebrati più diffusi e rappresentativi sulla faccia della terra e svolgono tutto il loro ciclo biologico, normalmente pluriennale, negli ecosistemi acquatici. Sono più facilmente individuabili e classificabili, anche da non esperti, rispetto agli invertebrati acquatici che sono, comunque, utilizzati nella determinazione dell'Indice Biotico Esteso (IBE) previsto dalla vigente normativa (D. Lgs. 152/99). I pesci occupano, inoltre, diversi livelli trofici e, quindi, possono rendere conto di perturbazioni occorrenti lungo tutta la rete trofica e nel corso di tutto l'anno o di più anni in virtù dei cicli biologici pluriennali. Da un punto di vista d'impatto emotivo sull'opinione pubblica, i pesci, essendo visibili e conosciuti da tutti, meglio si prestano ad essere utilizzati nelle campagne di sensibilizzazione dell'opinione pubblica e della classe politica chiamata a prendere decisioni in materia di tutela ambientale.

L'uso di organismi a vita libera, in particolare di ittiofauna, per saggi biologici e di bioaccumulo, si inserisce in metodologie adottate da tempo in altre nazioni (US-EPA, 1993) e supportate da una vasta letteratura (Johnson, 1998; Nimmo *et al.* , 1998; Kosmala *et al.*, 1999; Kasthuri e Chandran, 1997), mentre, in campo nazionale, il DLgs. 258/00 sottolinea la possibilità di effettuare determinazioni di bioaccumulo dei

contaminanti prioritari (PCB, DDT e Cd) su tessuti muscolari di specie ittiche residenti o su organismi macrobentonici, dove per bioaccumulo si intende l'accumulo di sostanze nei tessuti degli organismi attraverso le diverse vie di esposizione (Modugno *et al.*, 2005a, 2005d, 2006a). I pesci, infatti, vengono utilizzati come “bersaglio” indicante l'inquinamento marino e dulciacquicolo grazie alla loro ubiquitarietà e semplicità di cattura e di mantenimento in cattività. Lavori sperimentali hanno permesso di rilevare, in alcune specie di pesci catturati lungo le coste di tutto il mondo, le concentrazioni dei metalli pesanti “pericolosi” maggiormente presenti (Essink, 1989; Hornung & Kress, 1991; Pocklington & Wells, 1992; Otway, 1992; Rainbow & Phillips, 1993; Sharif *et al.*, 1991; Turgeon & O'Connor, 1991; Vukadin *et al.*, 1982). Nella normativa italiana ed europea, attualmente, non sono indicati valori limite o criteri di qualità precisi, ma vengono riportati, per questo motivo, a carattere puramente orientativo, alcuni valori numerici, raccolti nella letteratura, di indagini di bioaccumulo effettuate in passato su diversi organismi. Per le indagini di qualità ambientale, previste per le acque marine e di transizione, le indicazioni fornite dal DLgs 258/00 sono estremamente frammentarie. Occorre quindi farsi promotori di specifiche indagini, eseguite a livello di Enti Scientifici, volte a chiarire progressivamente due aspetti: • valutazione di valori soglia od analoghi per i test di tossicità che consentano di definire concretamente un livello di pericolosità ambientale • approfondimento, operando per classi di sostanza, delle interazioni tra specie chimiche, quanto meno nelle condizioni ambientali più usuali. Tuttavia, mentre esistono protocolli standardizzati per l'esecuzione di test di bioaccumulo e bioconcentrazione in laboratorio a flusso continuo con pesci d'acqua dolce, non esistono protocolli per test semistatici (a rinnovamento statico) in laboratorio per specie ittiche marine.

Col termine “biomarcatore” si intende qualsiasi parametro biochimico, strutturale, funzionale, comportamentale, o quant'altro sia misurabile all'interno dell'organismo, pesce che, in rapporto all'entità della grandezza misurata, possa essere riconosciuto come associato ad una potenziale o evidente modificazione dello stato di salute dell'organismo monitorato e, indirettamente, dell'ecosistema oggetto di biomonitoraggio. Normalmente si prendono in considerazione tre tipologie di biomarcatori: biomarcatori di esposizione, biomarcatori di effetto e biomarcatori di suscettibilità. Senza entrare nei dettagli tecnici, di seguito faremo riferimento alle prime

due tipologie. La specificità dei biomarcatori varia al variare del parametro indagato e del grado di integrazione, tendendo a diminuire all'aumentare dello stesso, cioè passando dal livello molecolare, al livello di organo/apparato. È bene, in ogni caso, precisare che la mancanza di specificità non deve essere sempre considerata un difetto. In molte circostanze, infatti, è bene poter disporre di biomarcatori che siano sensibili ma aspecifici affinché possano rendere conto di un generico malessere ambientale, meritevole o meno di essere indagato con metodiche più specifiche e mirate alla luce dei dati fino a quel momento acquisiti. Di seguito sono riportati alcuni esempi di biomarcatori e di tecniche di biomonitoraggio.

Gli indici somatici comunemente utilizzati nel biomonitoraggio sono: *condition factor* (rapporto peso/lunghezza), indice epatosomatico (rapporto peso epatico/peso corporeo), indice gonadosomatico (rapporto peso gonadi/peso corporeo), indice splenosomatico (rapporto peso milza/peso corporeo). Si tratta di indici aspecifici e generici che permettono un primo approccio nella valutazione dello stato di salute dell'organismo ittico campionato e rientrano normalmente nelle procedure necroscopiche volte all'evidenziazione di eventuali fenomeni patologici direttamente od indirettamente ascrivibili ad una perturbazione ambientale causata da inquinanti. Poiché vi possono essere notevoli variabilità in relazione alla stagione, all'età, al sesso ed alla maturazione sessuale, è di fondamentale importanza poter disporre di soggetti di controllo che differiscano dai soggetti monitorati esclusivamente per la provenienza da un sito sicuramente indenne da inquinamento.

Attraverso l'esecuzione della necroscopia su soggetti prelevati in ecosistemi acquatici sottoposti a biomonitoraggio, ci si prefigge lo scopo di valutare lo stato di salute degli organismi osservandone le lesioni esterne/ interne. Tali lesioni possono essere dirette conseguenze dell'azione tossica di eventuali inquinanti ma, più frequentemente, possono rappresentare l'esplicazione di una ridotta capacità reattivo-difensiva (immunodepressione) indotta dall'azione tossica subletale degli inquinanti stessi. In tal senso anche l'abnorme presenza di lesioni causate da agenti infettivi/infestivi indirizza spesso verso una diagnosi generica di immunodepressione frequentemente associata alla presenza, nell'ecosistema, di inquinanti organici ed inorganici. I dati ottenuti possono essere analizzati statisticamente, previa costituzione di classi numeriche fittizie per permettere un proficuo confronto con pesci appartenenti a gruppi di controllo.

In merito ai saggi di tossicologia acquatica, si può affermare che le sperimentazioni che prevedono l'impiego di pesci come organismi bersaglio, pur sembrando all'apparenza facilmente eseguibili, di fatto risultano, in modo particolare se si trattano organismi marini, tra i più complicati da applicare con risultati buoni, ma soprattutto ripetibili. Queste problematiche sono imputabili alla reale necessità di grandi volumi di acqua, se si parla di stadi giovanili delle specie, sia per il loro mantenimento in laboratorio sia per l'esecuzione dei test veri e propri. Risultano indispensabili conoscenze di allevamento, riproduzione e veterinaria della specie scelta, per riuscire a mantenere in buone condizioni lo stock di laboratorio per le analisi. Anche l'esperienza nel "manipolare" gli organismi, durante l'allestimento del saggio, può risultare fatale per la buona riuscita dell'esperimento.

8.2. Obiettivi

Pertanto, l'obiettivo del presente lavoro è stato di mettere a punto un sistema di monitoraggio biologico in grado di rilevare e segnalare le situazioni di criticità ambientale e di raccogliere contemporaneamente campioni acquosi. In particolar modo si è lavorato in funzione della gestione del dato ottenuto e quindi per garantire l'automazione e l'autonomia del sistema di misura in assenza di un operatore. Per raggiungere tali scopi prefissati, si è reso indispensabile lavorare in diversi set-up sperimentali: in condizioni controllate di laboratorio e direttamente in campo, in un sito che permette il prelievo diretto dell'acqua nella Rada di Priolo.

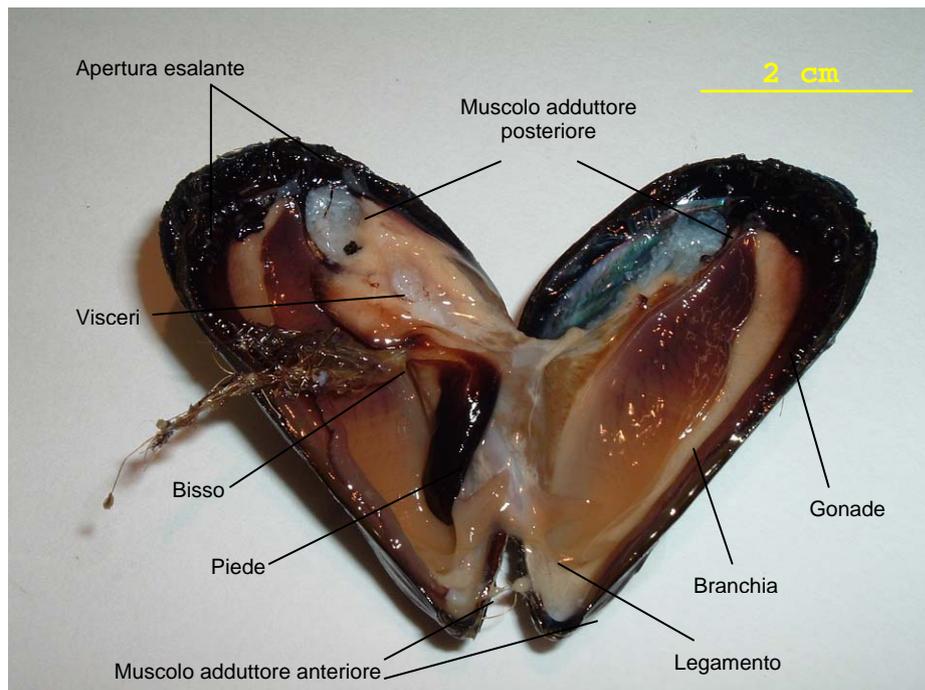
A supporto dell'applicazione sia dei sistemi BEWS, sia degli organismi sentinella (in laboratorio ed in campo) sono state messe a punto ed effettuate batterie di saggi ecotossicologici per analisi sia della matrice sedimento sia della matrice acqua. La scelta degli organismi da impiegare nelle suddette batterie è stata condizionata dalle informazioni derivanti dalle osservazioni subacquee eseguite nelle varie fasi.

Quindi la sperimentazione ha portato alla predisposizione di una strumentazione innovativa adottabile dalle Agenzie ambientali, le Amministrazioni Pubbliche e gli operatori del settore, in grado di rilevare le situazioni di emergenza e di limitarne gli effetti attraverso interventi attuabili in tempi rapidi.

8.3. Materiali e metodi

8.3.1. Organismo bersaglio per le sonde biologiche

Mytilus galloprovincialis (C8 Fig.1) è un bivalve a sessi separati, con individui che raggiungono l'età riproduttiva già dopo un anno dalla nascita.



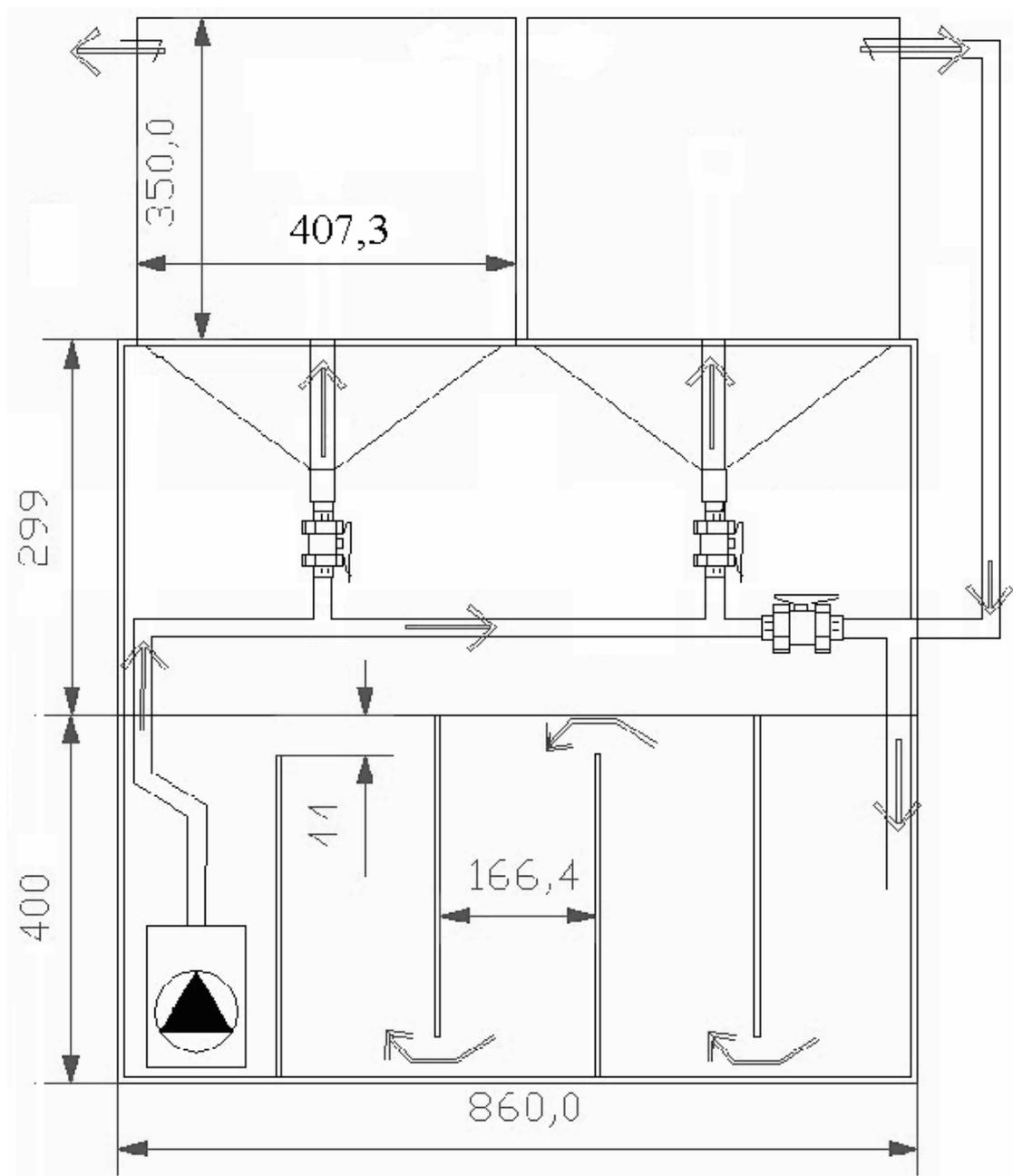
C8 Fig.1 – Organismo bersaglio: *Mytilus galloprovincialis*.

Il legamento elastico è esterno alla cerniera e viene teso quando le valve della conchiglia si chiudono per contrazione dei muscoli adduttori. Quando si recidono tali muscoli, utilizzando un bisturi inserito tra le valve, il legamento elastico riprende la forma iniziale e le valve della conchiglia si aprono.

Per eventuali approfondimenti riguardo la specie in questione, si rimanda a lavori in fase di pubblicazione inerenti alla messa a punto del protocollo per la valutazione della embriotossicità appunto con *Mytilus galloprovincialis* eseguiti dal Laboratorio Ittiologico di ARPA Emilia Romagna Sezione Provinciale di Ferrara.

Le cozze sono state prelevate in ambiente naturale (Vivaio Onda Blu situato nel Porto Grande di Siracusa) e trasportate in laboratorio a secco (in assenza di acqua) all'interno

di un contenitore termico. Gli organismi sono stati analizzati e quindi sono stati scartati immediatamente gli animali già morti o compromessi, selezionando attentamente tutti quelli con evidenti segni di rottura della conchiglia. I molluschi che hanno superato la selezione sono stati puliti dal detrito e dagli organismi epibionti (operazione eseguita manualmente mediante raschiatura) e quindi trasferiti all'interno dell'impianto di mantenimento. Per il mantenimento degli esemplari di *Mytilus galloprovincialis* si è predisposto un apposito impianto sperimentale pilota a ciclo chiuso su piccola scala (C8 Figg. 2). Tale apparato è costituito da due vasche tronco-coniche (A, B) in plexiglass della capacità di 45 litri ciascuna, operanti in ciclo chiuso. L'acqua di allevamento proviene da un sistema di filtrazione meccanico-biologica (L) situato esternamente rispetto alle vasche di allevamento e composto da 5 differenti comparti, ciascuno della capacità di 25 litri. Il primo comparto è riempito con materiale inerte (lana di vetro), mentre i successivi comparti con gusci di bivalvi (canestrelli). Questo materiale, oltre all'azione filtrante di tipo meccanico, svolge anche quella di supporto per la crescita dei microrganismi che operano la depurazione biologica (*nitrobacter* e *nitrosomonas*). Il filtro è stato inizialmente inoculato con materiale derivante da un esistente filtro funzionante per ridurre il tempo di attivazione. L'acqua viene immessa all'interno delle due vasche mediante una pompa con portata variabile (da 60 l/h a 600 l/h); il flusso dell'acqua nelle singole camere di mantenimento è mantenuto costante (400 ml/min) e può essere modificato regolando gli appositi rubinetti (D, E) creando un flusso ascendente. Tale impianto è stato riempito con acqua di mare sintetica preparata ricorrendo a miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quali Instant Ocean®. La salinità dell'acqua era al 30 ‰; il pH 8,3 e la temperatura di condizionamento di 20°C. La concentrazione dell'ossigeno disciolto è stata mantenuta tra il 60 e il 100% del valore di saturazione. Quando lo stock di cozze è portato in laboratorio, l'acqua deve essere cambiata in un periodo di 2 o più giorni per prevenire gli stress dovuti alla qualità dell'acqua; la temperatura deve essere variata a un tasso non superiore a 2°C/giorno e la salinità a un tasso non superiore a 5 g/Kg/giorno. Lo stock di cozze è stato controllato giornalmente riguardo eventuali segnali di stress e mortalità; i molluschi aventi le valve della conchiglia molto aperte ed insensibili quando toccate con una sonda sono stati considerati morti e quindi scartati. Se gli adulti possiedono adeguate riserve possono resistere anche per 6 o più settimane senza cibo. Nel nostro caso si è provveduto ad alimentare gli organismi mediante colture monospecifiche di alghe marine (*Dunaliella* sp. e *Thalassiosira pseudonana*).



C8 Fig.2 - Impianto di stabulazione e mantenimento del lotto di organismi impiegati.

(A – B) vasche tronco-coniche in plexiglass della capacità di 45 litri ciascuna;

(L) sistema di filtrazione meccanico-biologica composto da 5 differenti comparti,

ciascuno della capacità di 25 litri;

(D - E) rubinetti.

8.3.2. Realizzazione di un Sistema Complesso per il Biomonitoraggio

Il sistema complesso (C8 Fig.3) è costituito da:

- un BEWS (Biological Early Warning System), Mosselmonitor®, con funzioni di preallarme biologico, che utilizza come organismo sensore il mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*;
- una sonda multiparametrica, per la misura in continuo dei parametri chimico-fisici (ossigeno disciolto, pH, temperatura, conducibilità, etc.);
- un campionatore automatico per le acque, in grado di prelevare fino a 24 campioni d'acqua al giorno, successivamente all'innescò del segnale d'allarme ;
- un sistema computerizzato in grado di acquisire i dati, mettere in relazione i diversi parametri, identificare l'insorgenza di situazioni anomale ed associare ad ogni evento una serie di azioni (modificare la frequenza di acquisizione dei dati, azionare il campionatore automatico, inviare messaggi di allarme ad uno o più destinatari) e produrre un report di analisi che può essere gestito a distanza tramite computer remoto.



C8 Fig. 3 - Schema della struttura del Sistema Complesso.

8.3.3. Predisposizione del Laboratorio Mobile e del sistema di aspirazione d'acqua

Tale struttura fa riferimento a strumentazioni impiegate in monitoraggi ambientali eseguiti negli Stati Uniti secondo metodiche descritte nei manuali EPA (EPA, 2001). Il Laboratorio Mobile (C8 Fig.4) è stato allestito adattando un container di 20' refrigerato (in grado di garantire una temperatura da -20 a +15°C; consumi da 4 a 10 Kw; costruito in acciaio Corten) in modo da utilizzare le sonde multiparametriche, le sonde biologiche e i pesci sentinella in vasche (bins con raccordi di ingresso e uscita dell'acqua; sistema di troppo pieno e di anti-allagamento) alimentate da acqua di mare prelevata dalla costa antistante attraverso un sistema di prelievo adatto (pompa ad alta prevalenza con tenuta per acqua di mare, prefiltro e cestello in PVC per il posizionamento; manichette in rotoli per tubatura; raccordi di collegamento; impianto elettrico ed opportune sicurezze).

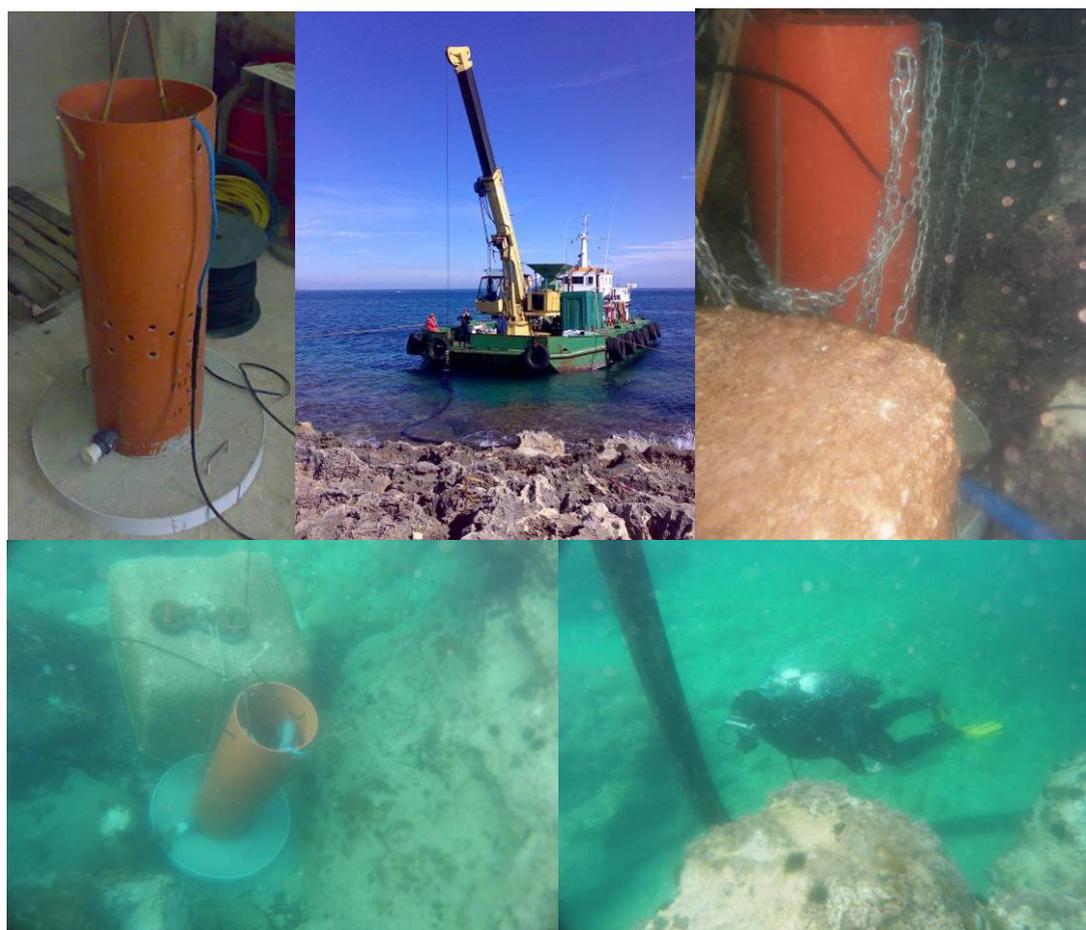
Tale stazione è stata posizionata in prossimità dello stabilimento della Ex Eternit Siciliana S.p.A. di Siracusa nelle vicinanze della battigia, in modo da ridurre al minimo la distanza dal punto di prelievo dell'acqua, identificato nel punto caratterizzato da maggior densità dei manufatti in cemento amianto.

L'utilizzo di una struttura come quella descritta si rende necessaria per standardizzare le letture in continuo delle sonde biologiche e per rendere omogeneo il dato, che si è ottenuto nella campagna di lettura, con quello registrato da studi condotti in laboratorio. In questo modo è stato altresì possibile mantenere *in loco* una struttura laboratoristica, allo scopo di facilitare le attività di ricerca e ottimizzarne le tempistiche.



C8 Fig.4 - Impianto di stabulazione e mantenimento del lotto di organismi impiegati.

La pompa a colonna e la tubatura per il rimando dell'acqua sono state inizialmente posizionate, sulla base delle informazioni che si sono ottenute dalla campagna subacquea di sopralluogo, con operazioni condotte da sub, in modo da fissarne la struttura e garantirne l'efficienza di funzionamento (C8 Fig.5). Successivamente, per guasti e rotture del suddetto sistema di pompaggio, a causa di forti mareggiate e di avverse condizioni meteorologiche, si è proceduto alla sostituzione della pompa sommersa con una non ad immersione, posizionata sulla battigia (C8 Fig.6 e 8).



C8 Fig.5 – Operazioni di installazione della prima pompa di aspirazione sommersa..

La struttura interna delle vasche e degli impianti idraulici ed elettrici sono stati predisposti per tempo, prima del posizionamento del container sul sito. I flussi di apporto di acqua sono regolati in modo da garantire una buona lettura da parte degli organismi sentinella impiegati, secondo protocolli utilizzati da ARPA Ferrara in precedenti indagini di monitoraggio. L'installazione, la manutenzione e l'utilizzo della strumentazione del Laboratorio Mobile, sono stati eseguiti a cura di tecnici ARPA.



C8 Fig.6 – Sistemazione della seconda pompa di aspirazione non sommersa..

All'interno del Laboratorio Mobile sono stati mantenuti standardizzati parametri quali temperatura interna, umidità, fotoperiodo e disturbo rumoroso. La lettura in continuo dei dati chimico fisici e biologici (C8 Fig.9) è stata graficata quotidianamente e resa disponibile in remoto tramite l'accesso ad un sito protetto. I possibili allarmi, che non si sono generati (viste le buone condizioni generali dell'acqua prelevata) al verificarsi di situazioni di anomalia o di criticità ambientale, sarebbero stati gestiti da due PC installati nel Laboratorio Mobile (C8 Fig.7).



C8 Fig.7 – Strumentazione di programmazione del laboratorio mobile..

Alla generazione di ogni allarme provocato artificialmente (visto che allarmi reali non si sono riscontrati) è stato effettuato un campionamento di acqua automatico ed istantaneo, tramite l'attivazione di un autocampionatore a cui è seguita un'immediata segnalazione via SMS e/o E-mail ad operatori ARPA.



C8 Fig.8 – Strumentazione di programmazione del laboratorio mobile..

Sui campioni d'acqua così ottenuti, sono state condotte analisi di laboratorio chimiche, fisiche ed ecotossicologiche da tecnici ARPA.



C8 Fig.9 – Allestimento interno del laboratorio mobile per l'esecuzione del monitoraggio biologico e chimico-fisico.

8.3.4. Monitoraggio biologico con molluschi sentinella (Mosselmonitor®)

Il Mosselmonitor® (C8 Fig.10) rappresenta una sonda biologica per la valutazione della qualità delle acque attraverso organismi viventi. La sonda permette l'installazione di otto esemplari adulti di *Mytilus galloprovincialis*, ad ognuno dei quali viene applicata una coppia di elettrodi. Il funzionamento dello strumento è legato alla valutazione percentuale del comportamento di apertura e chiusura delle valve di tali organismi, effettuata tramite una registrazione in continuo (una misura ogni 10 s) degli otto elettrodi.



C8 Fig.10: Mosselmonitor® in versione da campo

La posizione delle valve di ogni cozza è misurata continuamente (con periodi regolabile tra 10 e 600 secondi). Il segnale elettrico derivante dalle posizioni delle valve viene convertito internamente dal microcomputer attraverso il software a valori compresi tra 100 e 1000. Questi ultimi determinano la sensibilità dell'intero sistema e possono essere regolati con il menu incorporato nel programma (usando un terminale esterno per entrare nel sistema). La distanza fra gli elettrodi è il parametro che viene misurato e registrato nel tempo dall'elettronica presente nel corpo dello strumento e l'elaborazione di tale informazione produce allarmi di diverso tipo: in caso di chiusura prolungata delle valve (allarme C), decremento o incremento anomali dell'attività (allarmi D e A) oppure di morte (allarmi G), come specificato nel manuale d'uso fornito dalla ditta costruttrice. Pertanto, attraverso la registrazione dei movimenti delle valve all'interno di un microprocessore, e l'esecuzione di specifici calcoli su questi dati, è possibile accertare il comportamento della cozza. Per entrare nello specifico del funzionamento della sonda, si evidenzia che una tensione ad alta frequenza (250 kHz) attraversa il primo

avvolgimento (elettrodo 1) in modo da generare un campo magnetico che induce una tensione nel secondo avvolgimento (elettrodo 2). L'intensità del segnale indotto è proporzionale alla distanza tra i due avvolgimenti ed è perciò indicativa della posizione delle valve. Pertanto il sensore del Mosselmonitor® è la cozza stessa. Per evitare scambi tra i vari segnali misurati le tensioni sono trasmesse individualmente e lette solo sul corrispondente ricevitore (multiplexing). Per leggere la tensione indotta il segnale è rettificato e digitalizzato attraverso un convertitore A/D (analogico/digitale). Un microcomputer processa i dati e assicura il rispetto dei prefissati criteri di valutazione. Attraverso valutazioni interne il verificarsi di un allarme può essere accertato e indicato mediante il contatto libero da potenziale. I dati, gli allarmi e le altre possibili valutazioni possono essere interfacciati, attraverso un collegamento RS422, con un computer o con un terminale. Utilizzando come terminale un PC (in combinazione con il convertitore RS422 - RS232 fornito) questi dati possono essere scaricati, immagazzinati e processati.

Caratteristiche Biologiche:

- utilizzo di cozze (*Mytilus galloprovincialis*)
- 8 bivalvi per sistema

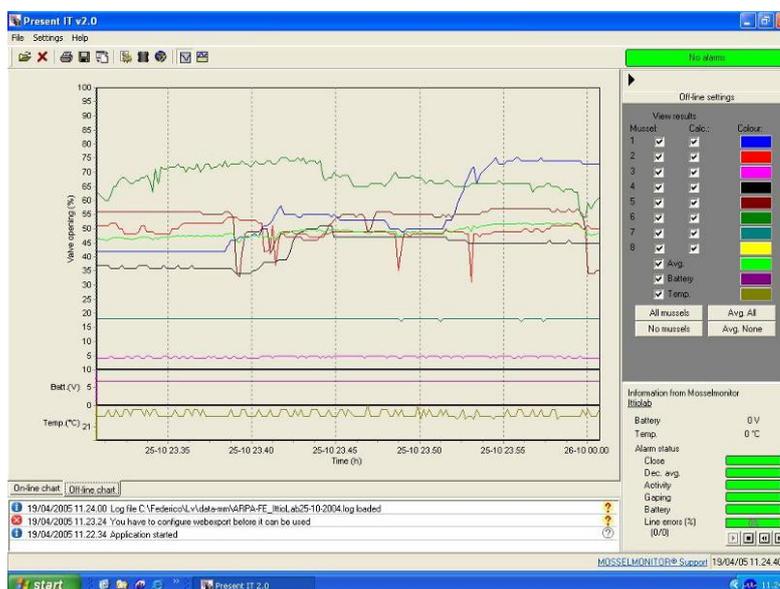
Caratteristiche Elettroniche:

- sensori multiplex ad alta frequenza (250 KH)
- computer Siemens 8051
- interfaccia per PC esterno (RS 232+RS 485)
- allacciamento elettrico esterno
- orologio
- temporizzatore di allarme
- convertitore A/C 12 bits
- autonomia della batteria fino a 3 giorni
- componenti elettronici montati su un telaio rimuovibile
- registrazione degli allarmi
- interruttore dell'allarme

Caratteristiche Meccaniche (versione da campo):

- contenitore in polietilene ad alta densità h=420 mm, Ø=320 mm
- cozze facilmente sostituibili
- massima profondità 15 m
- peso 22 kg

La ditta olandese Deltaconsult, costruttrice della sonda, fornisce a corredo software un programma (Present.IT2®) per la semplice gestione del Mosselmonitor®(C8 Fig.11).



C8 Fig. 11 - Esempio di lettura del comportamento delle cozze applicate alla sonda con il software Present.IT2®

Il software Present IT2 è stato sviluppato allo scopo di rappresentare in un grafico i dati provenienti dal Mosselmonitor® e ne permette l'archiviazione. Il programma analizza non solo le informazioni on-line provenienti dal Mosselmonitor® ma anche i dati precedentemente registrati; inoltre permette di stabilire una connessione diretta con lo strumento. Il programma è installato su un PC che è collegato direttamente al Mosselmonitor® attraverso una porta di comunicazione. E' possibile visualizzare i dati delle cozze sia individualmente che collettivamente e ne viene anche calcolato il valore medio.

Requisiti minimi:

- Intel Pentium processor
 - 32 MB internal memory (RAM)
 - 10 MB free space on harddisk
 - Microsoft Windows® 95, 98, 2000, NT4.0
- Requisiti raccomandati:
- Intel Pentium II processor
 - 128 MB internal memory (RAM)
 - 200 MB free space on harddisk
 - Microsoft Windows® 95, 98, 2000, NT4.0

8.3.4.1. *Programmazione del Software*

Il linguaggio utilizzato è LabVIEW, detto anche G Programming, nella versione 7 (release 2004). L'uso dell'applicazione software realizzata su PC senza licenza LabView è possibile installando una utilities, il LabVIEW Run Time Engine, previa creazione di un eseguibile con l'Add-On LabVIEW Application Builder.

Le conoscenze di base per comprensione della programmazione sono:

- sistemi operativi: MS®-DOS® e MS® Windows®;
- NI® LabVIEW®;
- realizzazione file batch di MS®-DOS®;
- protocolli HTTP, TCP/IP, FTP;
- protocolli USB, RS232, bus di campo;
- fondamenti di reti informatiche;
- fondamenti di ingegneria del software;
- fondamenti di HTML/WML;
- fondamenti di statistica;
- fondamenti di automazione;
- fondamenti di condizionamento dei segnali.

8.3.4.2. *Esperienze di laboratorio*

L'impiego di un biosensore non può prescindere dalla comprensione del comportamento dell'organismo bersaglio impiegato nel proprio ambiente e della sua fisiologia in relazione a parametri, gradienti e valori soglia caratteristici. Al fine di produrre le informazioni necessarie a tale scopo, sono state svolte diverse campagne di misura in "condizioni al contorno controllate", cioè imponendo alcune grandezze quali temperatura, salinità, ossigeno disciolto e garantendo o sospendendo l'alimentazione.

Le prove di laboratorio sono state eseguite in un impianto appositamente progettato (C8 Fig.12).



C8 Fig. 12 – Foto dell’impianto per l’installazione del *Mosselmonitor*[®] in laboratorio

Caratteristiche dell’impianto

	VASCA 1	VASCA 2
Volume (m³)	0.041	0.041
Portata flusso (l/h)	10	10
Filtrazione	Filtro meccanico biologico	Filtro meccanico biologico
Temperatura (°C)	22 ± 1	22 ± 1
Ossigenazione	Continua	Continua
Ciclo luminoso	Fotoperiodo naturale	Fotoperiodo naturale

Tabella 1: Esperienze in laboratorio: caratteristiche dell’impianto

Le prove di laboratorio sono state eseguite su 3 diversi lotti di mitili, secondo la seguente procedura:

- identificazione dell’area di prelievo;
- cattura;
- trasporto al laboratorio;
- condizionamento;
- selezione di esemplari per l’installazione sul Mosselmonitor[®];
- installazione e immersione in acqua (vasca 2);
- selezione “resta” di controllo;
- immersione “resta” di controllo in acqua (vasca 1);
- taratura del Mosselmonitor[®] (durata 12 ore);
- campagna di misura con Mosselmonitor[®]

8.3.5. Messa a punto di un test di embriotossicologia per il controllo della qualità delle acque marine a Priolo durante la fase *ante operam*

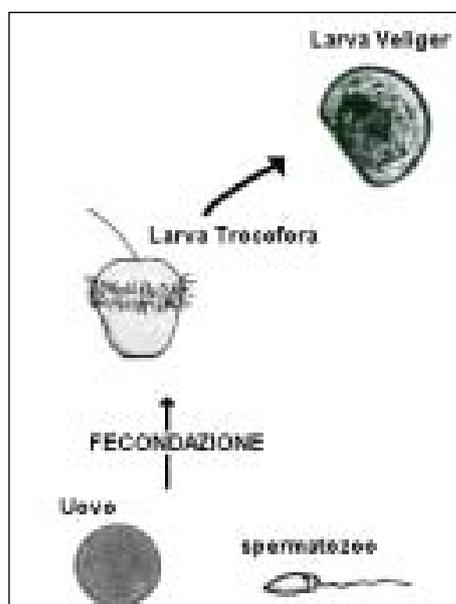
I molluschi bivalvi, organismi filtratori caratterizzati da relativa motilità, sono ampiamente utilizzati come bioindicatori dell'inquinamento marino e d'acqua dolce. Gli effetti dei contaminanti di origine antropica vengono valutati con studi di bioaccumulo, tecniche di biomarkers e con l'applicazione di saggi ecotossicologici che impiegano gli stadi più sensibili del ciclo vitale (embrioni e larve) (Volpi Ghirardini et al., 1995; His et al., 1997; Fossi, 2001; Berais et al., 2003; Ferrari et al., 2004). In questo lavoro è stata verificata l'applicazione in campo di una tecnica di induzione all'emissione dei gameti sulla cozza, *Mytilus galloprovincialis*, ai fini dell'ottenimento di uova fecondate di buona qualità da poter impiegare in saggi di embriotossicologia (ASTM, 1998). Per una rapida e corretta valutazione della qualità biologica delle acque della Rada di Priolo, si è ipotizzato l'impiego di indicatori biologici in associazione ad indicatori chimico-fisici già normalmente impiegati. L'utilizzo di tecniche embriotossicologiche ha consentito, dunque, di rilevare anche quelle sostanze inquinanti, le cui concentrazioni risultano inferiori a quelle misurabili attraverso queste tecniche di analisi. L'*end point* di queste metodiche ha permesso di evidenziare quegli eventuali danni a livello biologico, che si presentano in modo sinergico e possono produrre effetti diversi sulla specie bersaglio da quelli che produrrebbero se presenti singolarmente. Gli indicatori biologici possono, infatti, dare risposte valutando le quali si riesce a stimare o prevedere gli effetti di varie cause di stress sull'ambiente. Tali indicatori sono generalmente riferiti a specifiche comunità biologiche, ad esempio alla fauna ittica, ai molluschi, alle comunità macrozoobentoniche, ed alla distribuzione del fitoplancton e della vegetazione acquatica.

Gli indicatori biologici possono essere suddivisi in:

- Indicatori ecologici (ad esempio: gli indici biotici delle acque e la diversità di specie);
- Indicatori tossicologici (ad esempio: indicatori di bioaccumulo e test di tossicità).

Uova, embrioni e larve di bivalvi marini sono tra gli organismi più comunemente usati in test acuti di saggio della tossicità di inquinanti, come ad esempio metalli pesanti, pesticidi e detergenti, o per valutare la qualità biologica delle acque e dei sedimenti in aree costiere soggette ad effetti antropici (Volpi Ghirardini et al., 1995) La sensibilità e la rapidità di risposta degli stadi larvali ed embrionali dei molluschi bivalvi come bioindicatori da usare in saggi di tossicità è ampiamente riconosciuta a livello internazionale (US EPA, 1995). Attualmente in Italia, però, tali saggi di tossicità non sono ancora entrati a far parte delle indagini di routine per la valutazione della qualità delle acque marine costiere e di transizione. Nel saggio ecotossicologico con embrioni e larve di *Ruditapes philippinarum* la valutazione della tossicità degli inquinanti è basata sulla percentuale di larve D (primo stadio della larva veliger) anormali trovate dopo la fertilizzazione delle uova e la successiva incubazione per 24 ore nell'acqua sotto investigazione.

Durante tale periodo infatti l'organismo si trova in una fase particolarmente delicata dello sviluppo poiché si verificano delle importanti modificazioni fisiologiche che portano alla formazione del veliger (C8 Fig.13) e l'eventuale contatto con sostanze tossiche potrebbe provocare la morte, il rallentamento dello sviluppo, o uno sviluppo non corretto delle larve.



C8 Fig.13 - *Mytilus galloprovincialis*: prima fase dello sviluppo larvale.

I metalli pesanti eventualmente presenti nelle acque marino costiere, una volta immessi nell'ambiente tendono a permanervi secondo un certo fattore d'accumulo. Da diversi decenni però, la loro concentrazione è aumentata notevolmente in alcune aree, soprattutto in corrispondenza di grandi agglomerati urbani ed insediamenti industriali. Le più importanti fonti d'immissione dei metalli pesanti nell'ambiente marino sono gli sversamenti fluviali, i depositi atmosferici e gli apporti dalla geosfera (per esempio attraverso meccanismi d'erosione).

Alte concentrazioni si possono trovare in acque costali e negli estuari soggetti a fenomeni d'inquinamento. Alcuni metalli sono micronutrienti essenziale per la vita di molti organismi, come costituente di enzimi redox, se presenti nelle giuste concentrazioni; mentre se è in eccesso possono risultare tossici. Per esempio, studi su alcuni pesci, hanno mostrato come esposizioni degli organismi ad elevate concentrazioni di rame influiscano negativamente sulla loro capacità di assorbimento del sodio. Il rame, inoltre, se è presente insieme ad altri tossici può esercitare un effetto combinato sugli organismi; recenti studi hanno appunto evidenziato come il rame si presenta più additivo con cloro, zinco, cadmio e mercurio, mentre riduce la tossicità del cianuro.

I risultati delle attività condotte negli ultimi mesi in Rada di Priolo dalle ARPA coinvolte nel progetto VEGAM, in collaborazione con l'Università di Ferrara, hanno messo in luce che, nonostante i dati di valutazione chimico fisici risultino da analisi standardizzate e sicure, non sono comunque sufficienti per descrivere la qualità ed il rischio di un ambiente ad elevata complessità quale le zone di transizione. In particolare, ci si resi conto della necessità di applicare i saggi biologici a più tipi di matrici, compatibilmente con le caratteristiche delle specie testate. Ciò consente di ottenere diverse informazioni sulla qualità e comportamento delle miscele di contaminanti eventualmente presenti. Infatti, per ottenere una valutazione quanto più reale possibile dei livelli di tossicità degli inquinanti presenti in ambienti di questo tipo, l'ARPA e l'Università di Ferrara hanno ritenuto interessante inserire nel progetto di ricerca anche la messa a punto di un test embriotossicologico in campo con acqua di mare tal quale in associazione con dettagliate analisi chimico-fisiche, biochimiche e ed ecotossicologiche.

Per le considerazioni sopra esposte, l'obiettivo della presente sperimentazione è stato quello di mettere a punto una metodica, facilmente applicabile in condizioni sia di

laboratorio sia di campo, che sia in grado di affiancare i controlli di monitoraggio chimico fisico ambientali e possa fornire uno strumento di analisi e valutazione per quanto riguarda il controllo ambientale nella Rada di Priolo. In dettaglio, lo scopo del lavoro di ricerca, si è focalizzato sulla possibilità di analizzare la matrice acquosa tal quale nella fase pre operam di MISE. In sintesi, si è lavorato in funzione della predisposizione di uno strumento analitico innovativo, rivolto agli organi di controllo che hanno competenze in materia di monitoraggio dei siti soggetti a MISE o bonifica. Per quanto riguarda la fase operativa, si è scelto di valutare la sensibilità del test ecotossicologico con embrioni e larve di *Mytilus galloprovincialis*.

8.3.5.1. *Scelta dei riproduttori*

I riproduttori, esemplari di *Mytilus galloprovincialis* di almeno un anno di età, sono stati prelevati da un allevamento situato nel Porto Grande di Siracusa (Vivaio Onda Blu). Successivamente sono stati trasportati in laboratorio a secco, avvolti solo in un panno umido, all'interno di un contenitore termico. Una volta in laboratorio, si è proceduto alla verifica della loro maturità. Per fare ciò si sono sacrificati alcuni individui: questi sono stati aperti, forzando le valve ed incidendo col bisturi i muscoli adduttori, e sono state osservate le gonadi. Se l'individuo non aveva raggiunto la maturità sessuale, la gonade si presentava a riposo o non sufficientemente matura mostrando un aspetto particolarmente assottigliato e quasi trasparente, tanto che si riusciva ad intravedere il colore della conchiglia sottostante; viceversa se l'individuo era sessualmente maturo la gonade si presentava molto più sviluppata e se incisa con un bisturi si osservava un'abbondante fuoriuscita di gameti. Fatto ciò si è proceduto a costituire il lotto di riproduttori: dapprima sono stati scartati gli animali già morti o compromessi per la perdita di acqua, poi sono stati esclusi tutti quegli organismi malformati o con evidenti segni di rottura della conchiglia. Successivamente i molluschi che hanno superato la selezione sono stati puliti dal detrito e dagli organismi epibionti (mediante raschiatura manuale della conchiglia) e sciacquati rapidamente sotto acqua corrente.

8.3.5.2. Produzione dei gameti

I riproduttori di *Mytilus galloprovincialis* dello stock selezionato (60 organismi), sono stati indotti all'emissione di uova e spermatozoi applicando un protocollo per la stimolazione termica. Il metodo non prevedeva pretrattamenti, ma l'applicazione di un ciclo termico consistente nell'esporre le cozze (spostate dalla vasca a flusso continuo in altre vasche isolate) per 30 minuti ad acqua marina artificiale a 28°C (riscaldata utilizzando due riscaldatori elettrici ed un aeratore per favorirne il movimento). L'acqua utilizzata per la stimolazione era acqua marina naturale, a salinità 39‰ e pH 8,3.

Dal momento in cui la quasi totalità degli organismi apre le valve e riprende la filtrazione si attendono 20 minuti, quindi li si trasferisce in una seconda vasca contenente acqua alla temperatura di 22°C (C8 Fig.14). Anche in questo caso si può osservare la riapertura della valve e la ripresa della filtrazione. In caso di mancata emissione, dopo un'ora venivano somministrati uova e spermatozoi, ottenuti da alcuni organismi sacrificati, ed erano applicati ulteriori cicli termici a 28°C e 22°C alternativamente, fino ad ottenere l'emissione di almeno un paio di organismi di ambo i sessi.

Gli organismi emittenti sono stati prontamente rimossi per essere riposti nella vasca a flusso continuo e per poter subito esporre i gameti fecondi e quindi le larve formate all'acqua tal quale da testare.



C8 Fig. 14 – Resta di mitili di controllo nelle vasche del laboratorio mobile.

8.3.5.3. *Fecondazione dei gameti*

Una volta conclusa l'emissione gli organismi sono stati allontanati dalle camere test. Le uova sono state filtrate con un setaccio di maglia pari a 100 μm così da eliminare eventuali impurità, e trasferite in un cilindro portando il volume della sospensione a 500 mL con acqua pulita sempre alla temperatura di 22°C. In seguito, mantenendo in agitazione la sospensione di uova con l'aiuto di uno stantuffo (costituito da un bastone a cui viene attaccato un disco perforato), sono stati prelevati quattro campioni di 100 μL , e il numero di uova è stato contato al microscopio ottico utilizzando camere di sedimentazione. Si sono preparati poi 300 mL complessivi di soluzione di spermatozoi, ottenuti da almeno due maschi diversi, ed è stata osservata la mobilità dei gameti maschili al microscopio ottico. Successivamente sono state prelevate quattro aliquote di sospensione e dopo essere state fissate con formalina al 40% è stato contato il numero di spermatozoi, utilizzando una camera di Bürker.

Si è proceduto quindi alla fecondazione unendo al beaker contenente le uova una piccola quantità di sospensione di spermatozoi, tenendo conto che 2-3 mL di sospensione di spermatozoi sono sufficienti a fecondare 3-4 milioni di uova.

Dopo due ore si è verificato al microscopio il successo della fecondazione: la quasi totalità delle uova (il 90%) deve avere forma rotondeggiante, mostrare la membrana di fertilizzazione e l'emissione del globulo polare .

8.3.5.4. *Lettura dei campioni*

La lettura dei campioni viene eseguita al microscopio ottico utilizzando camere di sedimentazione, e consiste nel conteggio, per ogni camera test, dei primi 100 organismi, segnando il numero di larve che ha raggiunto un corretto e completo sviluppo dopo le 24 ore di incubazione (larve normali).

La categoria di larve anormali include:

Uova segmentate, embrioni normali o malformati che non hanno raggiunto lo stadio di veliger, trocofore e pre-veliger.

Veliger con mantello che protrude dalla conchiglia, veliger con conchiglia incompleta, con incisioni nel margine, o con cerniera convessa.

La categoria di larve normali, invece, comprende i veliger vivi con completo e normale sviluppo della conchiglia (larve-D).

8.3.5.5. *Analisi dei dati*

Il valore di EC_{50} è stato calcolato sulla base del numero di embrioni che dopo 24 ore dava origine a larve vive con completo e normale sviluppo della conchiglia (larve-D). Come *end point*, pertanto, sono stati utilizzati la mortalità, il rallentamento dello sviluppo (presenza di stadi embrionali, trocofore e preveliger) e la formazione di veliger deformi (con conchiglia incompleta, cerniera convessa, mantello che protrudeva dalla conchiglia, ecc.). La conta è stata effettuata per osservazione diretta di 100 individui in ogni camera test, utilizzando un microscopio rovesciato (100 x).

Il valore di EC_{50} è stato calcolato applicando il metodo statistico Trimmed Spearman-Kärber ai dati raccolti nel corso delle prove, mentre NOEC e LOEC sono state definite mediante ANOVA e test di Dunnett (previa trasformazione in arcsin dei dati e verifica della omogeneità delle varianze).

8.3.5.6. *Accettabilità del test*

Le condizioni di accettabilità di questo tipo di test sono le seguenti (ASTM, E 724-98):

- Tutte le camere test devono essere identiche.
- Devono essere fatte più repliche per ogni trattamento.
- Nelle camere test non devono essere aggiunte sostanze non contemplate nel saggio.
- Tutti gli animali inclusi nella camere test devono essere stati prodotti dagli stessi riproduttori nella medesima emissione.
- Il test deve avere inizio entro 4 ore dalla fecondazione degli embrioni.
- Al termine del test più del 70% degli embrioni del controllo deve aver raggiunto uno sviluppo corretto e completo.

- Le camere test devono essere incubate tutte alla stessa temperatura e per il medesimo tempo.
- La saturazione dell'ossigeno disciolto nelle soluzioni delle camere test deve essere compresa tra il 60 e il 100%.
- La differenza di temperatura tra inizio e fine test non deve essere superiore ad 1°C.

8.3.6. Monitoraggio biologico con pesci sentinella

Le acque marino costiere, in particolare della Rada di Priolo e dintorni, sono soggetti da potenziale inquinamento di origine antropico ed industriale ed il Laboratorio Ittiologico del Dipartimento Tecnico di ARPA sez. di Ferrara, che si è occupato negli ultimi anni di ricerca in campo ecotossicologico, insieme ai Tecnici di ARPA Sicilia ha cercato di valutare gli effetti delle sostanze tossiche sui sistemi biologici (POULIN, 1992) attraverso la messa a punto di protocolli e test in laboratorio.

L'uso di organismi a vita libera, in particolare di pesci, quali indicatori della qualità degli ambienti acquatici, si inserisce in metodologie adottate da tempo in altre nazioni (US-EPA, 1993; UNICHIM, 1999) e supportate da una vasta letteratura (JOHNSON, 1998; NIMMO et al., 1998; KOSMALA et al., 1999; KASTHURI e CHANDRAN, 1997), mentre, in campo nazionale, non sono ancora stati validati metodi che prevedono la possibilità di adottare tali organismi. Al riguardo, il Decreto Legislativo 152/99 affida all'APAT il compito di sviluppare studi e ricerche al fine di predisporre protocolli operativi in materia.

In tale ottica, le ARPA coinvolte in collaborazione con l'Università di Ferrara (dr. S. Modugno PhD), che già stanno operando con APAT nella realizzazione di protocolli per test di ittiotossicità acuti per l'analisi delle acque, propone l'utilizzo di diverse specie ittiche per saggi di tossicità prolungati in campo.

La capacità di alcune specie ittiche di sopportare senza problemi le condizioni di acquario (MELOTTI et al., 1992) nonché l'allevamento in gabbie galleggianti, ci permette di proporre una metodologia per test cronici (28 giorni) con pesci "sentinella" (PALAZZI et al., 2001) per consentire la valutazione di effetti più tipicamente subletali, quali sono quelli osservabili sull'accrescimento dell'organismo. Infatti, l'accrescimento, valutabile come velocità di crescita specifica, è l'espressione ultima di molteplici aspetti, sia di natura biochimica, fisiologica, come anche comportamentale, tutti potenzialmente alterabili, in vario grado, quando un organismo venga esposto ad una miscela di contaminanti (VIGANÒ, 1998). I test cronici si prestano anche alla valutazione degli effetti letali che pure potrebbero manifestarsi a causa dell'esposizione prolungata ai contaminanti. In generale, si tenga presente che la variabilità, talvolta elevata, sia delle fonti di contaminazione sia del corpo idrico che ne è recapito, può essere causa di una corrispondente variabilità degli effetti osservati. Pertanto, la mancata osservazione di effetti tossici in un preciso momento del regime idrologico del

corpo idrico, non esclude che si possano riscontrare effetti tossici attuando la sperimentazione in momenti e condizioni idrologiche differenti (IRSA-CNR, 1994). Per le considerazioni sopra esposte ed in funzione di una possibile situazione di criticità ambientale nel periodo 2006-2008 i Tecnici delle ARPA coinvolte nel progetto VEGAM, hanno ritenuto necessario intervenire in campo attuando un piano di controllo chimico-fisico, progettando di valutare tale criticità ambientale con saggi di tossicità acuta e cronica (14 giorni) utilizzando specie ittiche sentinella (*Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*). La novità metodologica proposta (C8 Fig.15), il saggio di tossicità prolungato in campo, deriva dalla possibilità di associare il metodo adottato negli Stati Uniti (US-EPA, 1993), che prevede l'utilizzo di specie ittiche per determinare la tossicità acuta su acque di scarico; con la proposta di metodo per saggio di tossicità prolungato in laboratorio prospettata dall'IRSA-CNR (VIGANÒ, 1998). Tale idea progettuale ci ha portato a ritenere idonee le seguenti specie ittiche: *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*.



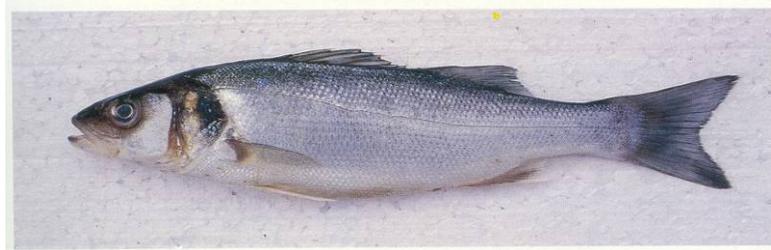
C8 Fig. 15 – Vasche del laboratorio mobile.

8.3.6.1. *Studio dell'organismo bersaglio in laboratorio*

Come organismi per il saggio si sono utilizzati forme giovanili di branzino ed orata (disponibili presso l'allevamento specializzato Acqua Azzurra s.r.l. di Pachino, Siracusa). Si sono privilegiati gli stadi giovanili per il loro facile adattamento alle condizioni di mantenimento in condizioni controllate ed alla fase di esecuzione del test. Infatti danno migliori informazioni sulla velocità di crescita, quale parametro fondamentale per la comprensione del test e risultano più sensibili degli stadi adulti, come si è potuto verificare attraverso test con sostanze tossiche (tossici di riferimento).

8.3.6.1.1. *Dicentrarchus labrax (L., 1758)*

Il branzino o spigola è un Teleosteo (C8 Fig.16), ordine Perciformi, appartenente alla famiglia Serranidae e al genere *Dicentrarchus*. Il branzino raggiunge lunghezza massima di circa 1 m e peso di 12-14 kg. Le taglie più frequenti sono comprese fra 30 e 60 cm. Il corpo è snello, slanciato, ricoperto di scaglie ctenoidi; scaglie cicloidi sono presenti sul capo nello spazio interorbitario. La colorazione del corpo è fondamentalmente argentea, col dorso grigio-verdastro ed il ventre bianco. I giovani hanno piccole macchie scure sui fianchi che scompaiono negli adulti (Tortonese, 1975). Non è presente dimorfismo sessuale. Il branzino presenta una distribuzione piuttosto ampia, essendo fortemente euritermo ed eurialino, presente in Atlantico da 30° di latitudine nord (coste del Marocco) fino a 55° di latitudine nord (mar Baltico). Si incontra su tutte le coste del Mediterraneo e dei mari comunicanti. È un pesce che vive di solito lungo le coste rocciose con l'abitudine di risalire i fiumi per parecchi chilometri e di frequentare le lagune salmastre; in primavera si porta alle foci dei fiumi o nelle lagune salmastre, dove di regola, la temperatura dell'acqua è più alta rispetto a quella del mare aperto. La causa delle migrazioni che effettua deve essere attribuita ai cambiamenti di salinità e temperatura in relazione alla riproduzione. Si adatta e cresce facilmente anche in acque quasi dolci. Le condizioni migliori di salinità variano dal 20‰ al 30‰. Mentre la temperatura ottimale è di 14-28 °C. Sotto i 7 °C cessa di alimentarsi.



C8 Fig. 16 – Branzino, *Dicentrarchus labrax*.

8.3.6.1.2. *Sparus aurata* (L., 1758)

L'orata (*Sparus aurata*) (C8 Fig.17) è un Teleosteo dell'ordine dei Perciformi, appartenente alla famiglia degli Sparidae. E' facilmente distinguibile dalle altre otto specie congeneri del Mediterraneo, principalmente per la colorazione: è contraddistinta da una ben evidente banda dorata alla sommità del capo, da cui prende il nome la specie. Altri caratteri distintivi rispetto alle specie congeneri sono la diversa morfologia e dentizione. L'orata è l'unica specie del genere *Sparus* nel Mediterraneo. Può raggiungere una lunghezza pari a circa 80 cm e peso di 15 kg ed ha una longevità fino a 20 anni (Tortonese, 1975); comuni sono gli esemplari lunghi 30-35 cm e del peso di circa un 1 Kg. E' presente lungo le coste dell'Atlantico, dal Senegal all'Inghilterra, e presso tutte le coste del Mediterraneo e del Mar Nero su fondali sia rocciosi che sabbioso-fangosi misti a rocce o in praterie di fanerogame; i giovanili sono presenti fino a 40 metri di profondità, gli adulti fino a circa 100 metri. È una specie eurialina che tollera salinità da 20 a 45 PSU, caratteristica che le permette di migrare in lagune e stagni costieri, in cui penetra, solitamente, all'inizio della primavera e che abbandona in inverno. Nella stagione invernale si sposta in acque profonde a scopo riproduttivo. La resistenza alle basse temperature è scarsa (valori minori di 5°C rappresentano la soglia letale), mentre resiste bene a temperature elevate (fino a 32-34°C). L'alimentazione è principalmente carnivora: si nutre di molluschi, preferibilmente bivalvi, triturando le conchiglie con le sue potenti mascelle, di crostacei e di piccoli pesci. In piccola parte la dieta può essere anche erbivora. *S. aurata* è una specie ermafrodita proterandra: nel corso della vita inverte il proprio sesso, assumendo per i primi 2 anni di vita caratteristiche sessuali maschili, e successivamente caratteri femminili tramite una trasformazione graduale del testicolo in ovario. La maturità sessuale maschile viene raggiunta a 20-30 cm, quella femminile a 35-40 cm; gli individui di maggiori

dimensioni sono pertanto quasi sempre femmine. Il periodo riproduttivo è tra ottobre e dicembre, quando la temperatura dell'acqua è compresa tra 14 e 16°C. I considerevoli progressi compiuti nell'ultimo decennio nel settore dell'acquacoltura marina hanno determinato, analogamente alla spigola, un sensibile perfezionamento delle tecniche di riproduzione e allevamento anche per questa specie eurialina (Melotti et al., 1999). La distribuzione degli impianti nel nostro paese e l'alimentazione fornita negli stessi è analoga a quella della spigola. L'orata, per la sua elevata capacità di adattarsi ad ambienti diversi e sfruttare la produttività degli ecosistemi naturali, viene allevata in monoculture estensive e semiestensive in alcuni ambienti umidi costieri.



C8 Fig. 17 – Orata, *Sparus aurata*.

8.3.6.2. La conduzione del test per le biometrie

Per procedere in modo corretto alle successive fasi di sperimentazione in laboratorio e in campo, si è pianificato di allestire esperimenti preliminari con *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*, così da ottenerne curve controllate di crescita biometrica, nella ricerca di una valutazione di effetti subletali per il test cronico. In particolar modo si è cercato di ottenere un metodo per il calcolo del fattore di condizione e della velocità di crescita specifica.

- vasche cubiche in plastica con capacità netta di circa 1000 litri, all'apice una struttura apposita per l'inserimento di una mangiatoia da esterno automatica;
- acquari della capacità unitaria di 120 litri, operanti in ciclo chiuso e in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni 3 ore, provvisti di un sistema di filtrazione meccanica e biologica (l'innesco dei filtri biologici richiede un'accurata preparazione preliminare e tempi medi di 40 giorni necessari all'insediamento delle popolazioni batteriche) nonché di un dispositivo per la termoregolazione delle acque, le quali devono avere una salinità di circa il 20‰, a temperatura di circa 20°C, un pH di 8.0-8.5. È possibile utilizzare acqua di rete preventivamente dechlorata;
- sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa;
- retini per il trasferimento dei pesci;
- reti o coperture trasparenti in materiale atossico per evitare la fuoriuscita degli animali dalle gabbie galleggianti o dagli acquari di laboratorio;
- mangime sfarinato con alimenti microincapsulati con formulazione variabile a seconda della specie ittica impiegata;
- sacchi di polietilene per il trasporto dei pesci;
- frigo portatile;
- bombola di ossigeno;
- analizzatore di ossigeno disciolto, analizzatore di pH e termometro per la misura istantanea della temperatura;
- bilancia analitica per la misura del peso dei pesci;
- ittiometro per la misura della lunghezza dei pesci.



C8 Fig. 18 – Strumentazione ed operazioni di biometria dei pesci.



C8 Fig. 19 – Campioni di pesci mantenuti nel laboratorio mobile e utilizzati per i test.

Tutti gli oggetti destinati ad entrare in contatto con l'acqua di mantenimento, o con l'acqua da saggiare, devono essere realizzati con materiali inerti, che non adsorbano significativamente i tossici e, tanto meno, possano rilasciarne. Il vetro borosilicato e le plastiche fluorurate dovrebbero essere impiegati ovunque possibile. Gli oggetti costruiti con questi materiali possono essere riutilizzati dopo le necessarie procedure di pulizia. Come organismi per il saggio si possono utilizzare giovanili di branzino o orata (quando disponibili presso gli allevamenti specializzati). Si privilegiano gli stadi giovanili in quanto: si adattano meglio alle condizioni di allevamento ed alla fase di svezzamento; danno migliori informazioni sulla velocità di crescita, quale parametro fondamentale per la comprensione del test; sono più sensibili degli stadi adulti, come si è potuto verificare attraverso test con sostanze tossiche (tossici di riferimento).

In seguito al loro invio al laboratorio, gli esemplari devono essere mantenuti in quarantena, per circa 20 giorni, al fine di poter individuare manifestazioni patologiche e mortalità derivanti dallo stress di trasporto e dall'acclimatazione alle nuove condizioni di allevamento (GHITTINO, 1983). Successivamente i pesci vengono suddivisi negli acquari. Durante il periodo di mantenimento e acclimatazione i pesci sono alimentati con un quantitativo giornaliero minimo di mangime sfarinato equivalente al 1-2 % del loro peso fresco (MELOTTI et al., 1992).



C8 Fig. 20 – Campioni di pesci stanziali catturati nel sito dell’Eternit a mare tramite pesca con nasse.

8.3.6.3. *Procedura per l’esecuzione di un saggio di tossicità prolungato*

Per effettuare un saggio di tossicità prolungato sulle acque marine costiere prelevate dal sito di studio presso la Rada di Priolo, si utilizza un minimo di dieci organismi. Gli effetti osservati nel gruppo di pesci esposti alle acque del corpo idrico vengono confrontati con quelli osservati in uno stesso numero di organismi di controllo mantenuti in laboratorio. Il saggio è organizzato limitando la scelta delle dimensioni dei pesci ad un ambito relativamente ristretto. Inoltre, la necessità di mantenere nelle gabbie galleggianti e negli acquari densità unitarie comprese tra 0,1 e 0,2 pesci/L e di valutare la velocità di crescita dei pesci nel corso della sperimentazione, comporta la scelta di taglie ridotte. È comunque opportuno non scendere al di sotto dei 3 cm per evitare, durante la manipolazione, il rischio di mortalità dovuto all’eccessiva delicatezza degli organismi. La misurazione della lunghezza totale si effettua dall’estremità anteriore del capo, e più precisamente dalla mascella, terminando all’estremità della pinna caudale. Per misurare accuratamente peso e lunghezza dei singoli individui è consigliabile che essi vengano anestetizzati. Questa operazione deve essere effettuata con pesci a digiuno da 24 ore. Si prepara una vaschetta contenente una soluzione di alcuni litri di anestetico, per esempio fenossietanolo alla concentrazione di 0,1 ml/L, debolmente aerata ed alla temperatura di 20 ± 1 °C e vi si trasferiscono gli animali per circa 5 minuti. Trattandosi di misurazioni di peso fresco è necessario adottare piccoli accorgimenti per minimizzare il rischio di errore dovuto alla presenza di gocce d’acqua sul corpo del pesce; queste

possono essere rimosse appoggiando delicatamente il pesce su carta da filtro o simile, senza danneggiare lo strato di muco protettivo; dopo aver valutato se l'organismo anestetizzato risponde ai requisiti di lunghezza e peso desiderati, si procede alla sua immersione in una vaschetta simile alla precedente, ma contenente solo acqua di diluizione, si attende che il pesce riprenda le sue attività funzionali e si trasferisce definitivamente o nel sacco di polietilene con cui i pesci vengono trasportati in campo o nell'acquario di laboratorio destinato a contenere i controlli. Per il trasferimento sul luogo di monitoraggio, gli organismi scelti sono immessi in sacchi di polietilene precedentemente riempiti con una quantità opportuna di acqua (1/3 del volume) dell'acquario di stabulazione. Ogni sacco viene gonfiato insufflando ossigeno (2/3 del volume) e posto all'interno di un frigo portatile. Una volta giunti al sito di monitoraggio, si procede al raggiungimento dell'equilibrio delle temperature sostituendo gradualmente l'acqua contenuta nel sacco con quella del corpo idrico. La gabbia galleggiante viene immersa nelle acque del corpo idrico e fissata con una fune, vi si introduce un minimo di 10 pesci e, successivamente, viene coperta con una rete per impedirne la fuga. Il trasferimento dei pesci deve essere effettuato con appositi retini, rapidamente e con la massima cura, per minimizzare lo stress e non danneggiare gli organismi. Periodicamente devono essere eseguiti controlli sulla tenuta e sulla pulizia delle gabbie galleggianti. Queste devono essere eventualmente sostituite se molto sporche o incrostate da alghe. Quotidianamente si deve provvedere alla rimozione degli eventuali organismi deceduti, sia in campo che in laboratorio. In base agli obiettivi del saggio e ai risultati ottenuti dai primi 14 giorni di esposizione, si può decidere di prolungare la sperimentazione sino al 28° giorno. Il giorno stesso del termine del test i pesci vengono di nuovo portati in laboratorio, con la stessa metodica di trasporto iniziale, e anestetizzati per essere pesati e misurati. In laboratorio, nella vasca di controllo, devono essere mantenute le stesse condizioni di illuminazione (circa 300 lux) cui gli animali sono stati acclimatati. Il fotoperiodo deve coincidere, per quanto possibile, con il fotoperiodo naturale. La temperatura deve essere mantenuta simile alla temperatura media esterna (± 2 °C) per l'intera durata della sperimentazione. Non è opportuno condurre il saggio quando la temperatura naturale non è idonea all'accrescimento dei pesci. L'alimento somministrato ai pesci, sia in laboratorio che in campo, è un mangime pellettato, specifico per le specie eurialine, e caratterizzato da un tenore proteico pari al 45% s.s. e un contenuto lipidico del 12,5% s.s. Durante la sperimentazione, i pesci di controllo in laboratorio devono essere alimentati

quotidianamente con una quantità di mangime equivalente al 2% del loro peso fresco, mentre i pesci sentinella sono alimentati quotidianamente, pari circa al 10-15% in peso, a causa della maggiore dispersione dovuta alla struttura particolare della gabbia galleggiante. A parità di altre condizioni, la velocità di crescita è strettamente dipendente dalla quantità di alimento disponibile; pertanto, la somministrazione giornaliera della dieta deve essere attentamente controllata. La distribuzione del mangime deve essere interrotta 24 ore prima di effettuare il rilievo dei parametri biometrici dei pesci, evitando così che i processi digestivi possano interferire in modo significativo. L'alimentazione, quindi, viene sospesa prima dell'allestimento del saggio, come pure al 27° giorno di trattamento. Per un corretto svolgimento della ricerca è necessario misurare quotidianamente la concentrazione di ossigeno disciolto sia nell'acqua del corpo idrico che nell'acquario di laboratorio contenente i controlli. Nell'acquario di controllo il valore dell'ossigeno deve essere superiore al 60% del valore di saturazione per l'intera durata della sperimentazione. È opportuno predisporre apposite schede di laboratorio e di campo per registrare quotidianamente i valori di temperatura, di ossigeno disciolto, di pH e di eventuali altri parametri chimico-fisici di interesse per la fase sperimentale, il numero di pesci morti e ogni altra alterazione osservabile (cambiamento della colorazione, perdita di equilibrio, nuoto scoordinato, aumento della velocità respiratoria, ecc.).

8.3.6.4. *Espressione dei risultati*

I risultati del saggio sono considerati validi se nell'acquario contenente gli organismi di controllo si osserva una mortalità $\leq 10\%$ ed una concentrazione di ossigeno disciolto $\geq 60\%$ del valore di saturazione. Al termine del saggio vengono considerati i valori di peso e lunghezza dei singoli organismi. Vista l'impossibilità nel metodo proposto di riconoscere il singolo pesce (in alcune sperimentazioni questo si ottiene attraverso la marcatura), per l'espressione dei risultati si effettua una valutazione di tipo intermedio che consiste nel calcolo della velocità di crescita "pseudo" specifica (r) come indicato da Viganò (1998) attraverso la seguente formula:

$$r = [(\log_e w_2 - \log_e w_{1\text{medio}})/(t_2 - t_1)] \times 100$$

dove:

w_1 e w_2 = peso (in grammi) rilevato ai tempi t_1 e t_2 ;

t_1, t_2 = inizio e termine della sperimentazione.

In pratica, non potendo fare riferimento al peso di quel determinato individuo al tempo t_1 , l'accrescimento dell'organismo in esame viene valutato usando come riferimento il peso medio dell'intero gruppo di pesci immesso nella vasca al tempo t_1 , che è indicato come $w_{1\text{medio}}$.

La significatività della differenza tra i valori di lunghezza, peso e velocità di crescita r degli organismi esposti ed i valori corrispondenti degli organismi di controllo viene verificata mediante il test t di Student. Se vengono evidenziate differenze statisticamente significative per almeno uno dei parametri, si può affermare che il corpo idrico monitorato contiene concentrazioni di contaminanti tali da ridurre l'accrescimento dei pesci. Lo scopo dell'analisi statistica è di confrontare le risposte degli organismi che sono stati esposti con quelle degli organismi di controllo e di valutare se le eventuali differenze, ad esempio di taglia corporea, siano da considerare significative e quindi imputabili agli inquinanti presenti nel campione stesso.

La relativa facilità d'uso dei programmi disponibili in commercio non deve fuorviare e si consiglia di avvalersi sempre della collaborazione di un esperto di statistica che possa consigliare sulla scelta dei metodi di analisi più appropriati.

8.3.7. Saggi ecotossicologici con batterie multispecie

Dopo aver costruito e messo a punto una batteria di saggi ecotossicologici, su indicazione dei risultati ottenuti dai biologici operatori subacquei che si sono occupati delle ricerche bionomiche, sono stati eseguiti test sulle matrici acqua e sedimento marino campionato nelle stazioni sia della Ex Eternit sia del controllo (Punta Mola). I test hanno riguardato saggi acuti e cronici di:

1. interferenza della bioluminescenza batterica;
2. inibizione della crescita microalgale;
3. tossicità acuta su rotiferi;
4. tossicità acuta e cronica su crostacei;
5. tossicità ed embriotossicità su molluschi bivalvi;
6. tossicità acuta e cronica, in laboratorio ed in campo, su pesci.

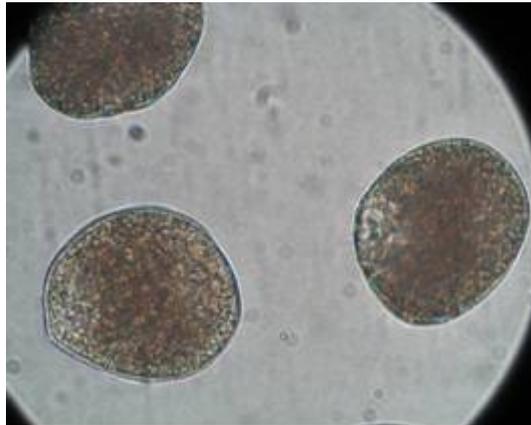
Si possono qui anticipare i risultati, dato che ogni saggio effettuato ha dato esito negativo, non evidenziando alcun tipo di ecotossicità riferibile ai campioni effettuati.

8.4. Risultati

8.4.1. Risultati test embriotossicologico

Il test è stato eseguito con acqua tal quale per verificare la buona qualità delle acque prima che cominciassero i lavori di MISE con possibile risospensione di materiali sul fondo marino e con possibile biodisponibilità delle fibre di amianto. Il dato importante è che non si sono registrate mortalità e malformazioni, quindi si può concludere che le acque marine, prima della fase di bonifica, non presentavano caratteristiche chimico-fisiche anormali e presenza di microinquinanti.

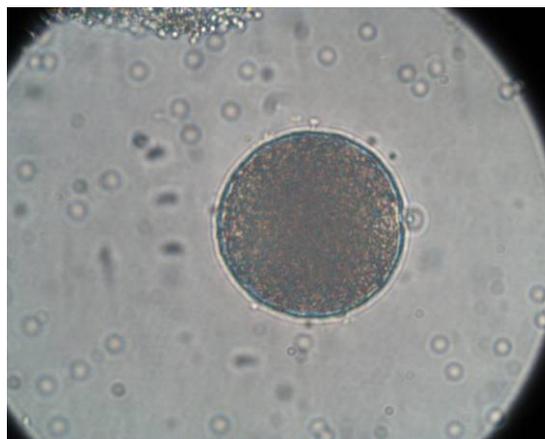
8.4.1.1. *Allegato fotografico*



(ingrandimento 40x) *M. galloprovincialis*: uova.

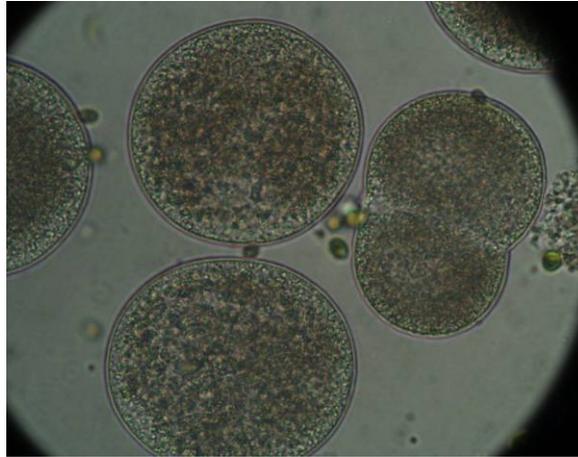


(ingrandimento 100x) *M. galloprovincialis*: spermatozoi.

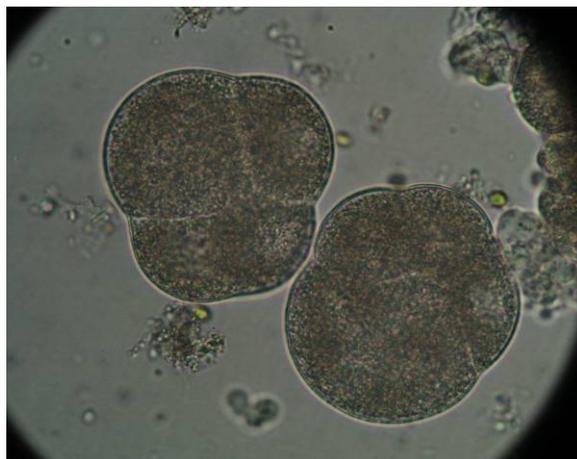


M. galloprovincialis: uovo fecondato, si noti la presenza del globulo polare.

Di seguito vengono riportate le foto relative ad immagini scattate al microscopio durante la fase di lettura dei campioni



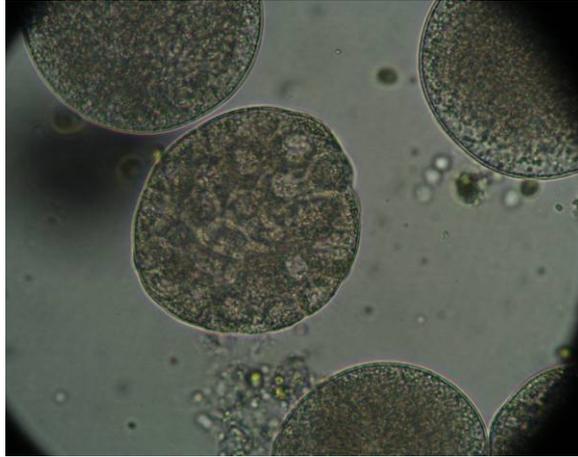
M. galloprovincialis: prima divisione, stadio 2 cellule.



M. galloprovincialis: seconda e terza divisione, stadi 4 e 8 cellule



M. galloprovincialis: stadio successivo di divisione cellulare.



M. galloprovincialis: formazione della morula.



M. galloprovincialis: trocofora.



M. galloprovincialis: trocofora, inizio formazione della conchiglia.



M. galloprovincialis: trocofora, formazione della conchiglia.



M. galloprovincialis: veliger deforme, valva incompleta, incisione nella conchiglia e cerniera convessa.



M. galloprovincialis: veliger deforme, mantello che protrude dalla conchiglia e incisioni nel margine della conchiglia.



M. galloprovincialis: organismo deforme.

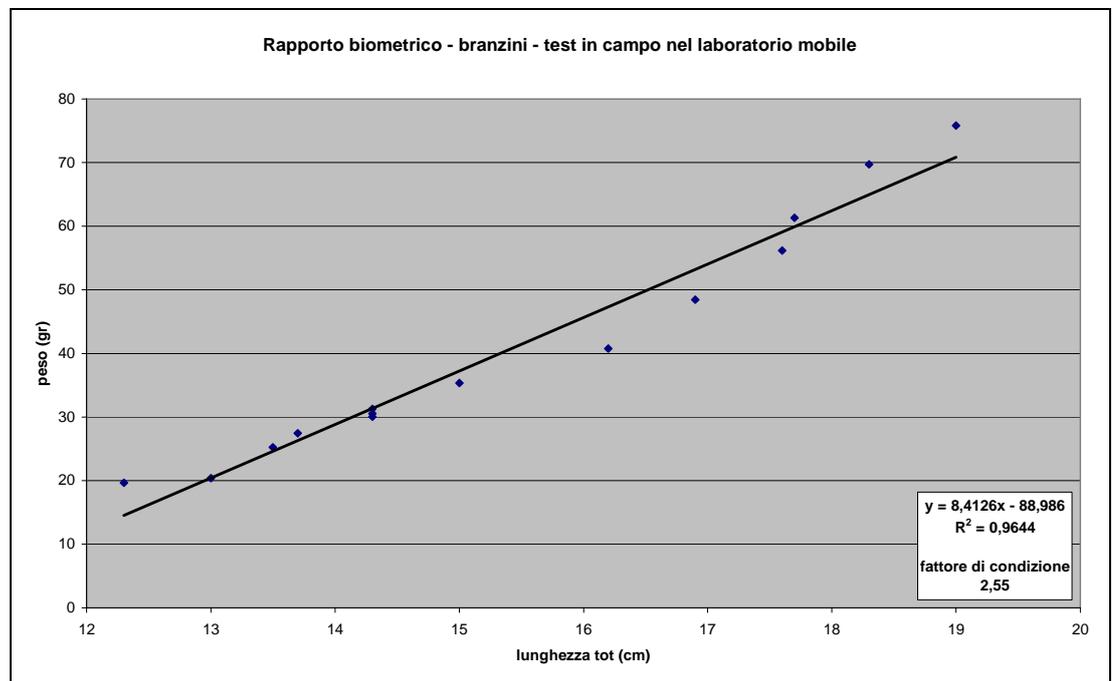
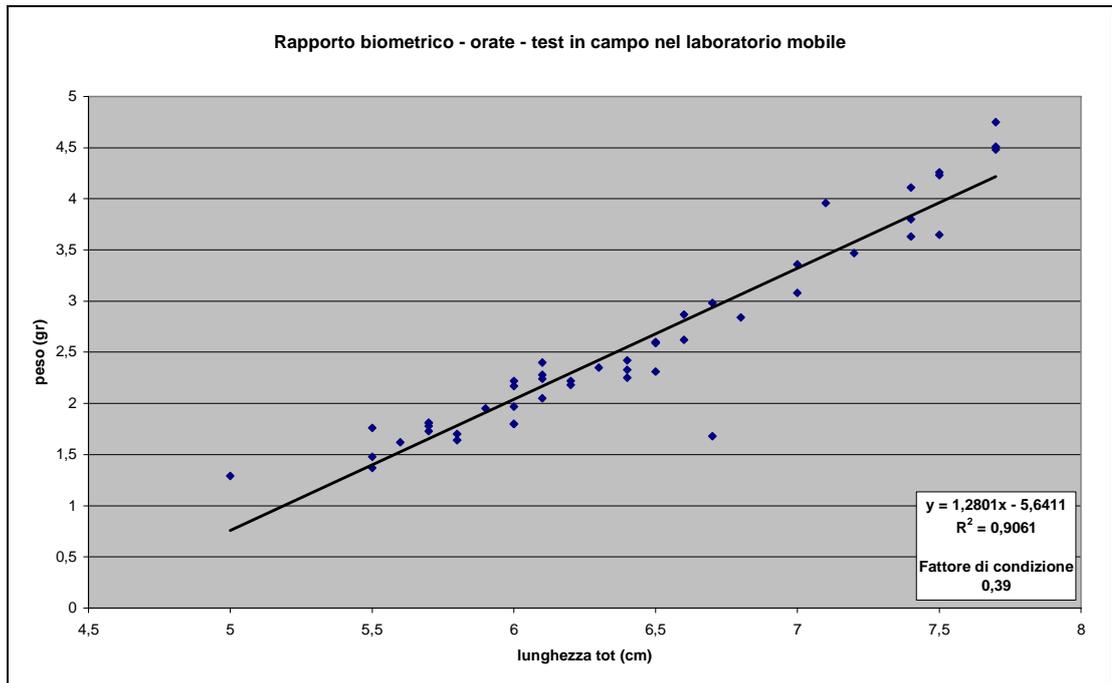


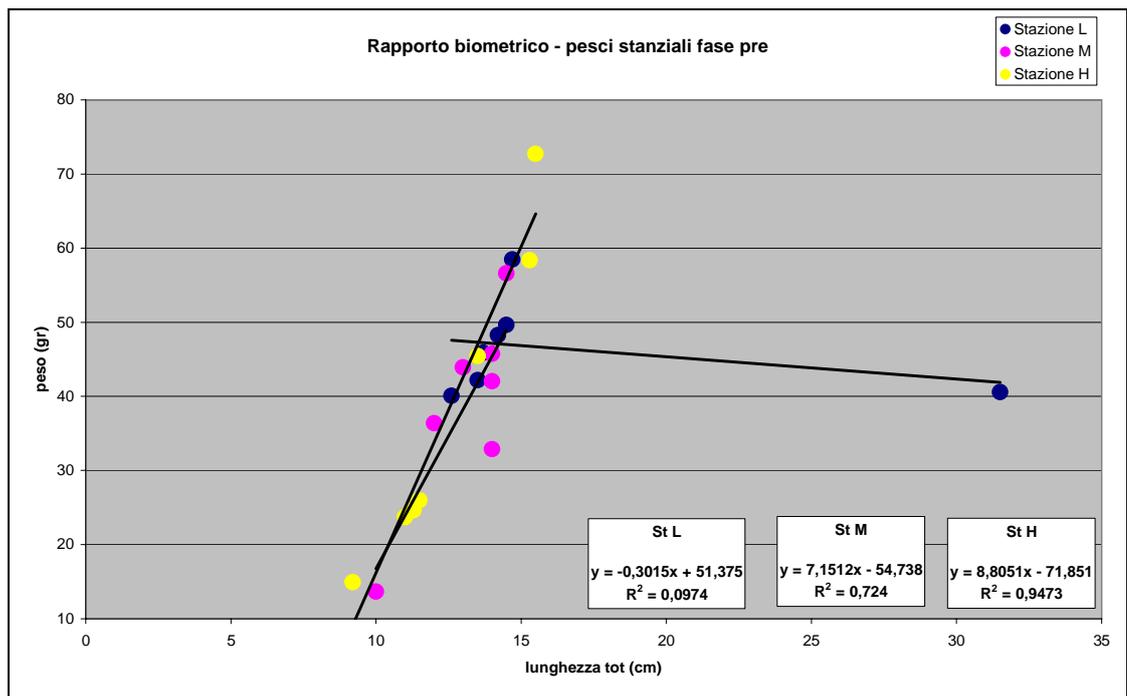
M. galloprovincialis: pre-veliger.



M. galloprovincialis: veliger.

8.4.2. Risultati dell'analisi biometrica dei pesci





Come si può notare dai grafici precedenti, sia i pesci impiegati nei test, sia quelli campionati in natura mostrano buoni rapporti biometrici e anche buoni fattori di condizione.

8.4.3. Analisi su biota, acqua e sedimenti

Sono state eseguite analisi sia sui pesci utilizzati nei test di laboratorio sia sui pesci stanziali campionati nei siti a Priolo. Sul tessuto omogenato degli organismi sono state condotte analisi relative alla determinazione di metalli pesanti, IPA, PCB. Le stesse analisi sono state impostate anche per valutare la condizione dei sedimenti. Tutte le analisi effettuate hanno dato come risultato o esiti non significativi o comunque entro la norma. Di seguito riportiamo le voci dei parametri ricercati sia per le analisi dei .

Analisi chimiche:

Parametro	Unità misura
Azoto Ammoniacale	mg/L (NH ⁴⁺)
Azoto Nitroso	mg/L (N)
Azoto Nitrico	mg/L (N)
Azoto tot	mg/L (N)
Fosforo tot	µg/L (P)
Fosforo reattivo	µg/L (P)

Analisi granulometrica:

Parametro	Unità misura
Scheletro (<2 mm)	%
Sabbia (2000-1000 µm)	%
Sabbia (1000-500 µm)	%
Sabbia (500-205 µm)	%
Sabbia (250-125 µm)	%
Sabbia (125-63 µm)	%
Sabbia (63-50 µm)	%
Limo (50-20 µm)	%
Limo (20-2 µm)	%
Argilla (<2 mm)	%

Analisi si metalli pesanti e chimico-fisiche:

Parametro	Unità misura
Ni	mg/kg SS
As	mg/kg SS
Cd	mg/kg SS
Hg	mg/kg SS
Pb	mg/kg SS
Cr tot	mg/kg SS
Residuo 105°C	%
Fosforo tot	% SS (P)
Azoto tot	% SS (N)

Analisi dei pesticidi:

DISERBANTI 510	Unità misura
Alaclor	µg/kg SS
Atrazina	µg/kg SS
Metolaclor	µg/kg SS
Molinate	µg/kg SS
Oxadiazon	µg/kg SS
Pendimetalin	µg/kg SS
Propanil	µg/kg SS
Simazina	µg/kg SS
Terbutilazina	µg/kg SS
Tiobencarb	µg/kg SS
ORGANO CLORURATI 510	Unità misura
Aldrin	µg/kg SS
Dieldrin	µg/kg SS
Endrin	µg/kg SS
Esaclorobenzene	µg/kg SS
HCH Alfa	µg/kg SS
HCH Beta	µg/kg SS
Lindano (HCH Gamma)	µg/kg SS
o,p' DDD	µg/kg SS
o,p' DDE	µg/kg SS
o,p' DDT	µg/kg SS
p,p' DDD	µg/kg SS
p,p' DDE	µg/kg SS
p,p' DDT	µg/kg SS
Endosulfan (somma isomeri)	µg/kg SS
Eptacloro	µg/kg SS
Epatacloro Epossido	µg/kg SS

Analisi degli IPA totali:

Parametro	Unità misura
T3CB-28	µg/g SS
T4CB-52	µg/g SS
P5CB-101	µg/g SS
T4CB-81	µg/g SS
T4CB-77	µg/g SS
P5CB-118	µg/g SS
H6CB-153	µg/g SS
H6CB-138	µg/g SS
P5CB-126	µg/g SS
H6CB-128	µg/g SS
H6CB-156	µg/g SS
H7CB-180	µg/g SS
H6CB-169	µg/g SS

Analisi degli idrocarburi:

Parametri	Unità misura
Naftalene	ug/g
Acenaftilene	ug/g
Acenaftene	ug/g
Fluorene	ug/g
Fenantrene	ug/g
Antracene	ug/g
Fluorantene	ug/g
Pirene	ug/g
Benzo(a)antracene	ug/g
Crisene	ug/g
Benzo(b)+Benzo(j)fluorantene	ug/g
Benzo(k)fluorantene	ug/g
Benzo(e)pirene	ug/g
Benzo(a)pirene	ug/g
Indeno(1,2,3,c,d)pirene	ug/g
Dibenzo(a,h)antracene	ug/g
Benzo(g,h,i)perilene	ug/g
Dibenzo(a,l)pirene	ug/g
Dibenzo(a,e)pirene	ug/g
Dibenzo(a,i)pirene	ug/g
Dibenzo(a,h)pirene	ug/g

8.4.4. Risultati Monitoraggio BEWS

8.4.4.1. *Risultati sistema complesso*

Dai dati ottenuti in fase sperimentale, si può evincere che, *Mytilus galloprovincialis*, come organismo bersaglio impiegato nei saggi di embriotossicità, ha dimostrato essere quindi un buon bioindicatore. Per quanto riguarda le possibili ricadute applicative, la cozza potrebbe essere utilizzata, dunque, nel controllo ambientale della limitrofa Rada di Augusta nell'ambito di un sistema di allarme precoce, per l'analisi ecotossicologica di campioni di acque prelevati in seguito a segnali di preallarme, come quelli forniti ad esempio da un Mosselmonitor® (Brunelli *et al.*, 2004; Modugno *et al.*, 2005). In particolare, i saggi su embrioni consentono di confermare la presenza di eventuali sostanze tossiche e di valutarne l'impatto tossicologico, permettendo tempestivamente di approfondire le indagini analitiche, di ricercare e, possibilmente, rimuovere le cause della tossicità. Attualmente i test con molluschi bivalvi sono usati in Francia per valutare la qualità delle acque marino costiere della Baia di Arcachon (His *et al.*, 1997; Geffard *et al.*, 2001) e in Italia per valutare la tossicità di alcuni composti di interesse ambientale, come i pesticidi e il rame (Losso *et al.*, 2004), ma la prospettiva futura è che entrino a far parte delle analisi di routine per la valutazione della qualità delle acque degli ambienti marini costieri in generale, ma soprattutto di quelle zone in cui sono presenti colture o banchi naturali di bivalvi. In conclusione, si può affermare che le finalità proposte in questo lavoro sono state raggiunte, alla luce di quanto esposto si propone quindi tale metodo come strumento di monitoraggio per gli ambienti marino costieri soggetti a MISE o bonifica.

8.4.4.2. *Realizzazione del software*

Allo scopo di ottenere una maggiore automazione e sicurezza nell'elaborazione dei dati rispetto al programma fornito dalla ditta, si è resa necessaria la realizzazione ex novo di un pacchetto software dedicato. Tale software intelligente è in grado di gestire il flusso di dati, di predisporre la taratura iniziale dello strumento e di eseguire automaticamente la diagnostica sugli allarmi registrati. Per realizzare un tale programma, sono state prima sviluppate le applicazioni di misura e successivamente si è messo a punto il coordinamento delle attività e la gestione dei dati. Il risultato è stato il collaudo di un

processo che, partendo dalla misura in campo, arriva alla presentazione del dato georeferenziato sul web, fino a definire un esempio di monitoraggio on-line.

Nella programmazione software sono stati risolti alcuni problemi legati al formato di memorizzazione dei dati, al formato/contenuto dei file e all'organizzazione generale delle locazioni di memoria. Tali inconvenienti sono da registrarsi come noti per le applicazioni da destinare agli utenti finali di prodotti di questo tipo, in quanto solitamente non interessati al data processing "avanzato" realizzato nel nostro caso. La realizzazione del software è stata inizialmente dedicata alla predisposizione dei drivers per gli strumenti e successivamente per la loro integrazione fino a costituire uno strumento di valutazione per le analisi dei dati di monitoraggio. Dopo un primo collaudo in laboratorio, per la definitiva messa a punto, il sistema ha richiesto ulteriori informazioni, che sono state acquisite da alcune esperienze in campo. Secondo un concetto di modularità, il software che si utilizza prevede di poter includere collegamenti con altre strumentazioni e altri applicativi software. Preliminarmente alla realizzazione dell'applicazione software che gestisce i dati del Sistema Complesso abbiamo definito i requisiti che dovevano essere soddisfatti: acquisire dati dal biosensore, dalla sonda multiparametrica, dal campionatore di acque, elaborare i dati di misura; presentare i dati producendo report comprensibili, grafici e pagine web, gestire i dati da remoto e, attraverso trasmissione a distanza, inviare a chi di dovere gli allarmi generati.

Per assolvere a tali requisiti è stato scelto il software LabVIEW® della statunitense National Instruments®. Il software è stato preferito ad altri per la capacità di operare con i protocolli USB, RS232, TCP/IP, FTP, e-mail, per l'elevata connettività e per la trasportabilità su piattaforme diverse. Inoltre tale software è già in uso presso altre strutture di ARPA, il che può facilitare la realizzazione di un sistema di monitoraggio on-line, con un'unica "cabina di regia" presso un preposto servizio. Abbiamo sviluppato i drivers per gli strumenti e in un secondo tempo si sono definite le procedure per la gestione dei dati.

In dettaglio, il sistema software realizzato è costituito dai seguenti moduli:

- Data Manager
- Driver Mosselmonitor®
- Driver sonda multiparametrica

- On-line Mosselmonitor® (via FTP)
- On-line sonda multiparametrica (via FTP)
- Comunicazione via e-mail e modem (allerta)

Il Data Manager è l'applicazione principale, nella quale vengono visualizzati i dati acquisiti in tempo reale e dove vengono processati i pre-allarmi, fino a produrre l'allarme vero e proprio.

Il Driver Mosselmonitor®, rappresenta uno strumento che lavora al confronto dei risultati di un periodo di misura, in funzione di diverse impostazioni dei valori di soglia per la produzione dell'allarme. Tale capacità è essenziale per determinare il set giusto e per eliminare il disturbo di fondo caratteristico del sito di misura. Inoltre, converte i dati del software proprietario secondo uno standard definito e ne perfeziona l'informazione sugli allarmi.

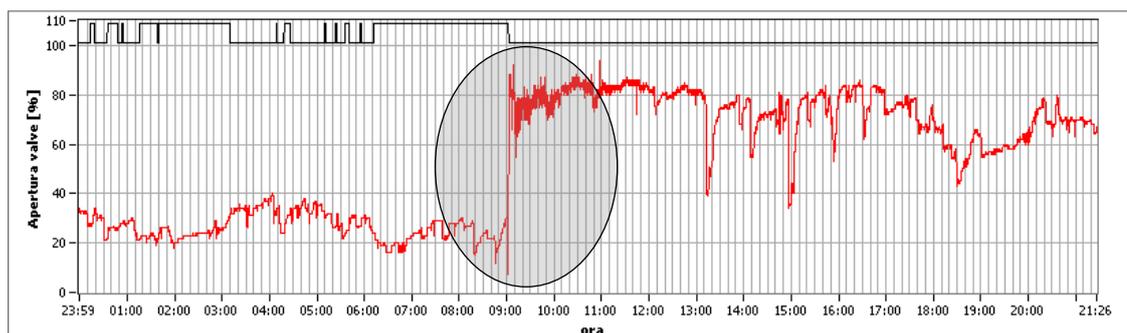
Il Driver sonda multiparametrica produce un grafico dei dati, ne verifica la corrispondenza con gli intervalli predefiniti (tenendo conto della stagionalità) e fornisce anche l'array di allarmi, suddiviso per sensore di misura.

Per entrambi gli strumenti vengono prodotti grafici giornalieri, successivamente inseriti all'interno di pagine web. Quindi il risultato è l'aggiornamento di un sito intranet/internet in automatico, tramite una pagina web contenente una breve descrizione delle misure effettuate, corredata dalla georeferenziazione delle informazioni di monitoraggio e dai relativi grafici sopra menzionati.

I protocolli di comunicazione di allerta, sono stati sviluppati per i telefoni cellulari (modulo via modem 56kb) ed per la posta elettronica. L'allerta viene attivata tramite il Data Manager a seguito dell'elaborazione dei dati e permette di contattare un elenco di nominativi tramite una chiamata sul telefono cellulare e/o tramite e-mail.

8.4.4.3. Collaudo del funzionamento della sonda biologica

Attraverso test specifici si è arrivati a verificare, in condizioni controllate di laboratorio, che le cozze installate sulla sonda hanno dimostrato un buon adattamento (mortalità nulla) e un limitato livello di stress. Tale fase di collaudo sperimentale è stata effettuata in un periodo di circa 6 mesi. Per valutare questo stato di adattamento abbiamo controllato il comportamento degli organismi installati sulla sonda confrontandolo con quello relativo ad organismi, sempre appartenenti allo stesso lotto di origine, mantenuti nelle medesime condizioni. Quando sottoposte a stress ambientale di diverso tipo (mancanza di luce, forte rumore e vibrazioni, etc.) hanno evidenziato un comportamento variabile e differente (chiusura momentanea non classificabile come allarme). Infatti gli organismi applicati alla sonda sono stati in grado di segnalare una situazione di stress termico attraverso una variazione del loro normale comportamento, con una progressiva diminuzione di apertura delle valve, dovuta al rallentamento e abbassamento dell'attività metabolica (Graf.1).



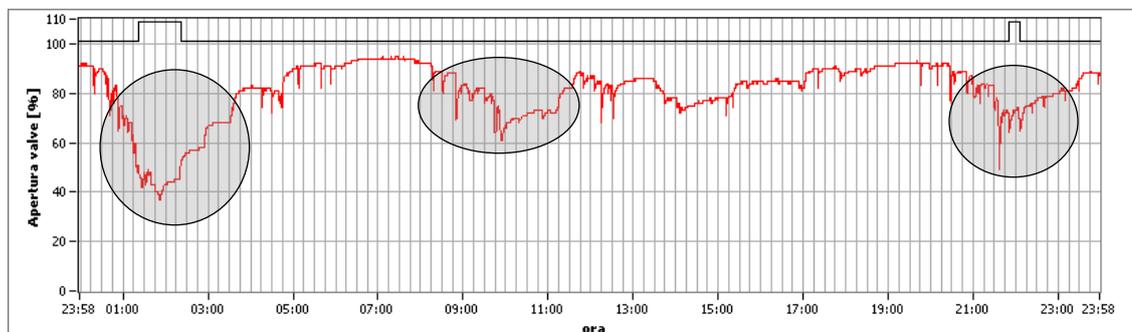
Graf. 1 – Ritaratura dello strumento in funzione della modificazione della temperatura

In questo grafico si mette in evidenza il comportamento degli organismi in relazione alla ritaratura della sonda, sulla base del fatto che, nel periodo considerato, subiscono il passaggio da una temperatura di circa 26°C ad una temperatura di circa 16°C. Si nota come la percentuale di apertura, prima della taratura, si attesti attorno al 30%.

Durante la fase sperimentale in laboratorio si è ben compreso come alcune modificazioni ambientali richiedano la ritaratura specifica dello strumento, necessaria ogni qual volta si verificano variazioni ambientali significative (ad esempio la stagionalità). Infatti si è visto che il normale comportamento delle cozze comporta un'apertura delle valve approssimativamente del 70-80%, imputabile alla normale attività filtratoria e respiratoria. Le conchiglie si chiudono solo occasionalmente e si riaprono dopo un brevissimo periodo.

Si è anche verificato che i diversi movimenti che una cozza può fare in risposta a stimoli di tipo ambientale si possono così riassumere:

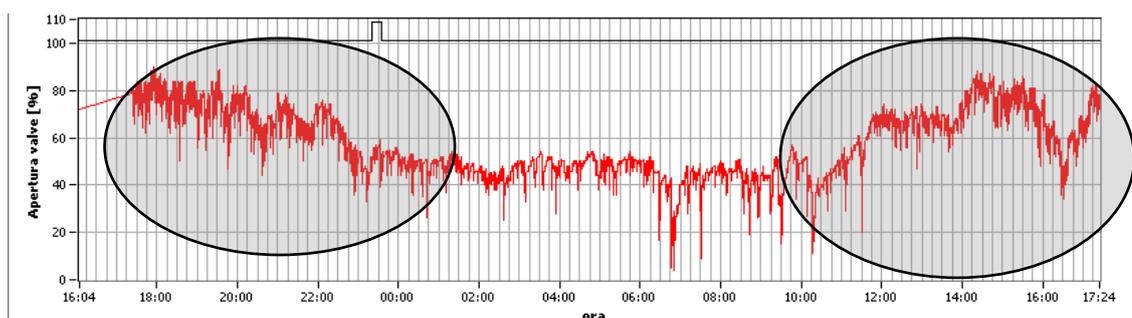
- Mantenimento delle valve chiuse per un determinato (breve/medio/lungo) periodo (Graf.2)



Graf. 2 - Periodi di chiusura brevi, medi e lunghi

Nel grafico vengono evidenziati alcuni periodi diversi per intensità e per durata di chiusura delle valve: da circa le ore 00:00 alle 04:00 si può notare un fenomeno di chiusura prolungata; dalle ore 10:00 alle ore 11:30 si può notare una chiusura di medio periodo; mentre circa alle ore 21:45 si verifica una chiusura di breve durata.

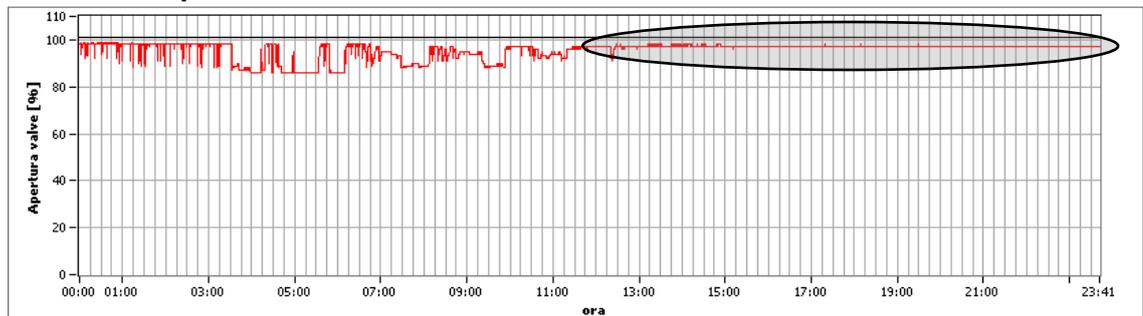
- L'aumento del livello di attività, in altre parole della frequenza di apertura-chiusura delle valve rispetto alla normale situazione di *flapping* (Graf.3).



Graf. 3 - Variazione del comportamento in seguito ad alimentazione

Nel grafico si possono notare tre momenti caratteristici della variazione comportamentale nell'apertura delle valve, legati alla somministrazione di cibo (colture algali a concentrazione nota). E' evidente l'incremento del *flapping* (frequenza veloce di apertura e chiusura delle valve, valutabile come una veloce oscillazione) nei due periodi evidenziati, durante i quali gli organismi hanno filtrato il nutrimento.

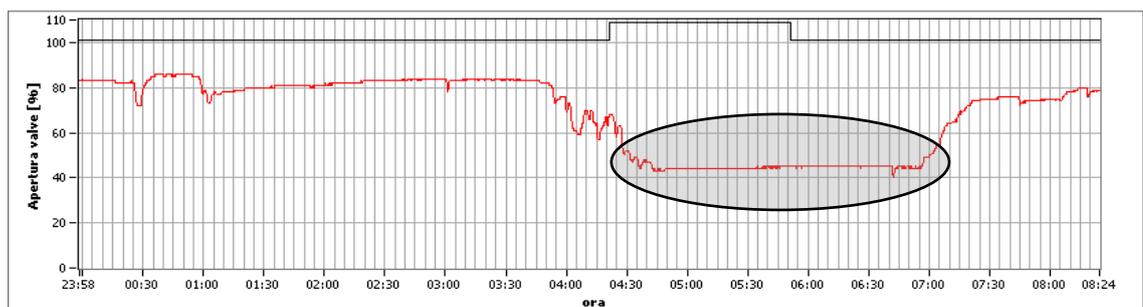
- Assenza di ulteriori movimenti; le valve si aprono molto di più rispetto alla normale posizione di apertura massima. Questo succede quando le cozze non sono più vive (*gaping*).



Graf. 4 - Fenomeno di *gaping* in relazione alla morte di un lotto sperimentale di organismi

Nel grafico soprastante si può notare come gli organismi, una volta morti, possano dare origine a ulteriori segnali di apertura massima dovuti a misure riconducibili al movimento delle valve non più controllate dalla muscolatura (tessuti e muscolo adduttore) del mitilo, in quanto degenerati, e in balia dei movimenti delle correnti o di organismi predatori.

Di seguito viene riportato un altro esempio di allarme da noi causato e controllato, allo scopo di migliorare la comprensione dei report prodotti dal sistema (Graf.5).



Graf. 5 - Comportamento in relazione ad una improvvisa ed accidentale mancanza di flusso

Nel grafico precedente viene visualizzato un allarme di tipo prolungato (chiusura parziale da un 80% ad un 40%, per circa 3,5 ore), generato a seguito di una interruzione del flusso ascendente che veniva costantemente mantenuto nella vasca monitorata con la sonda. La comprensione e la corretta lettura di tipo biologico è di fondamentale importanza per la gestione futura degli allarmi che si potranno registrare una volta impiegata la sonda in ambiente naturale. Infatti si può notare come, prima della

chiusura, gli organismi tentino per un certo periodo (circa 1 ora), aprendo e chiudendo le valve, di proseguire la normale attività. Si nota bene che, una volta riconosciuta la situazione di stress, le cozze rimangono più chiuse fino al momento in cui non si è deciso di riattivare il flusso, delineando una diminuzione dell'attività filtratoria.

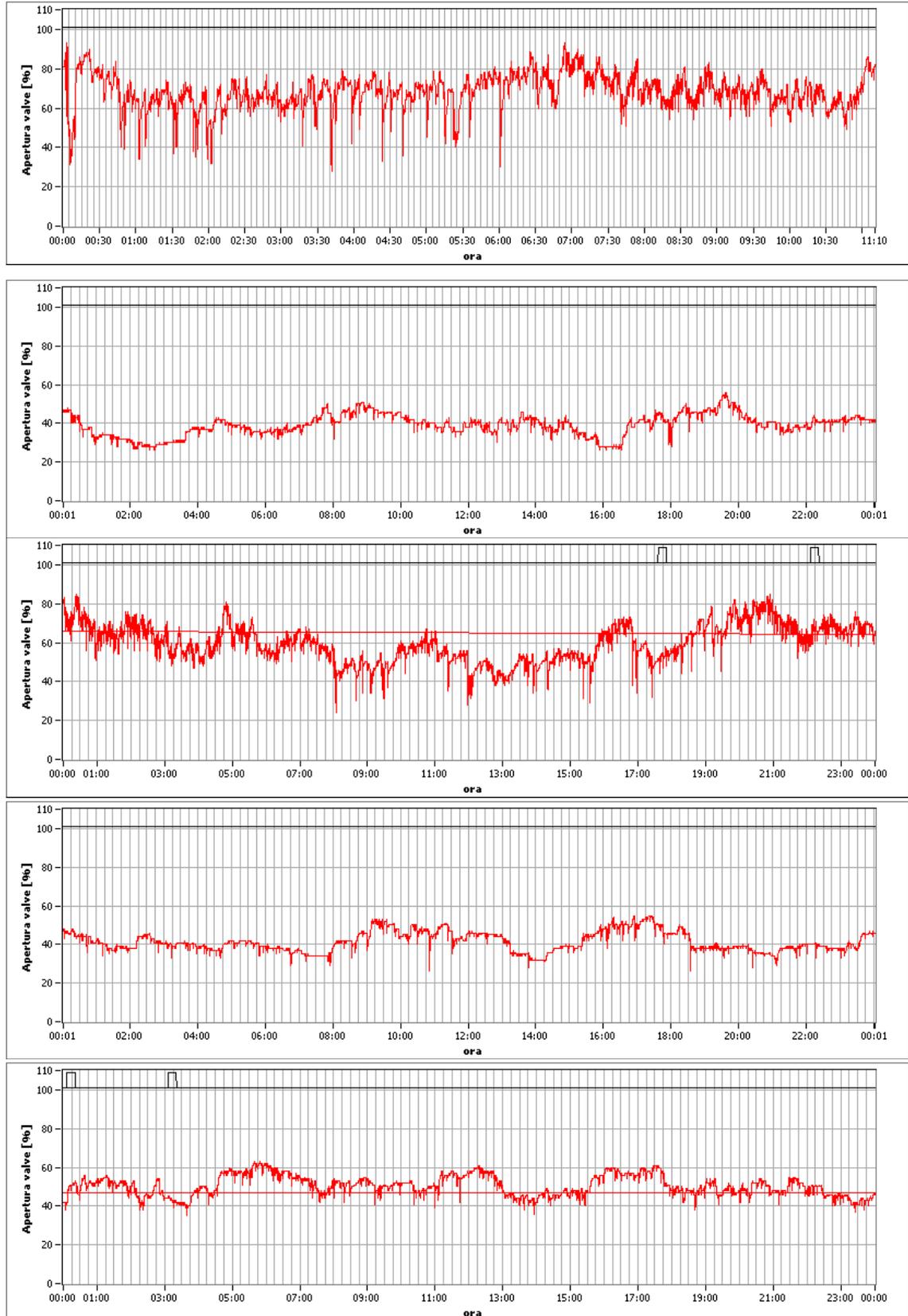
Dato che il comportamento di ciascuna cozza è misurato individualmente abbiamo notato che le eventuali riduzioni della sensibilità del sistema, causate dalle naturali differenze fisiologiche tra gli organismi, sono evitate mediante l'analisi dei dati medi misurati, come ben evidenziato dai grafici, dove la linea rossa rappresenta il comportamento medio degli otto organismi in test.

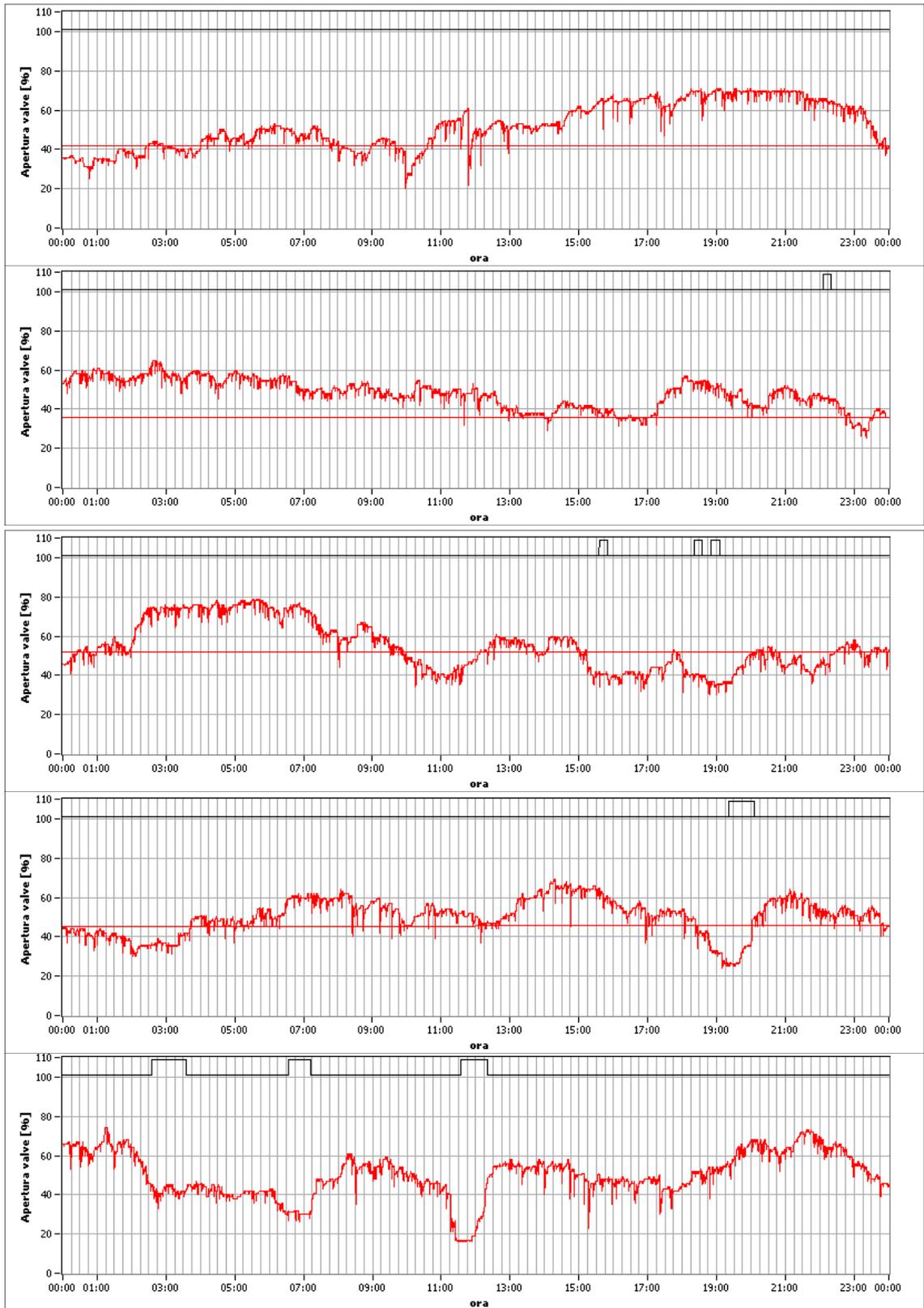
Durante la fase di installazione delle cozze sulla sonda, ci siamo ben resi conto di quanto le dimensioni morfometriche incidano sulla bontà del segnale, infatti i valori assoluti determinati variavano da cozza a cozza in base alle differenti dimensioni, e dipendevano dalla configurazione e dalla regolazione dei sensori, pertanto abbiamo deciso di utilizzare organismi della stessa dimensione e dello stesso lotto di appartenenza della dimensione di circa 5 ± 1 cm.

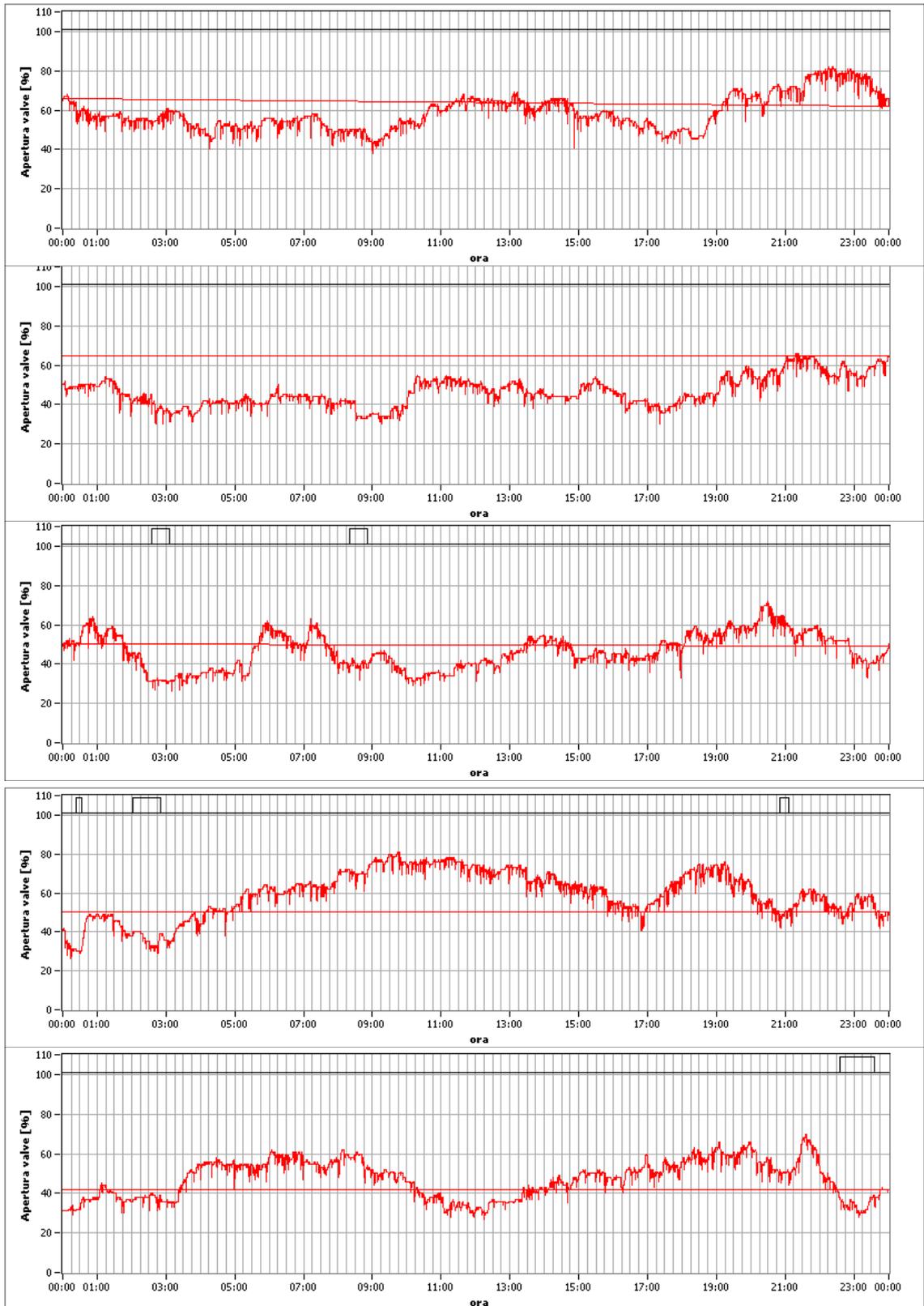
Nella fase di taratura, eseguita mediante il software, è stato determinato il valore minimo (0% = chiusura a secco) e un massimo (100% = elettrodi fuori portata), misurati individualmente per ciascuna cozza. Sulla base di questi parametri soglia, abbiamo impostato via software dei limiti, che se superati, generano allarmi, diversi per intensità e durata.

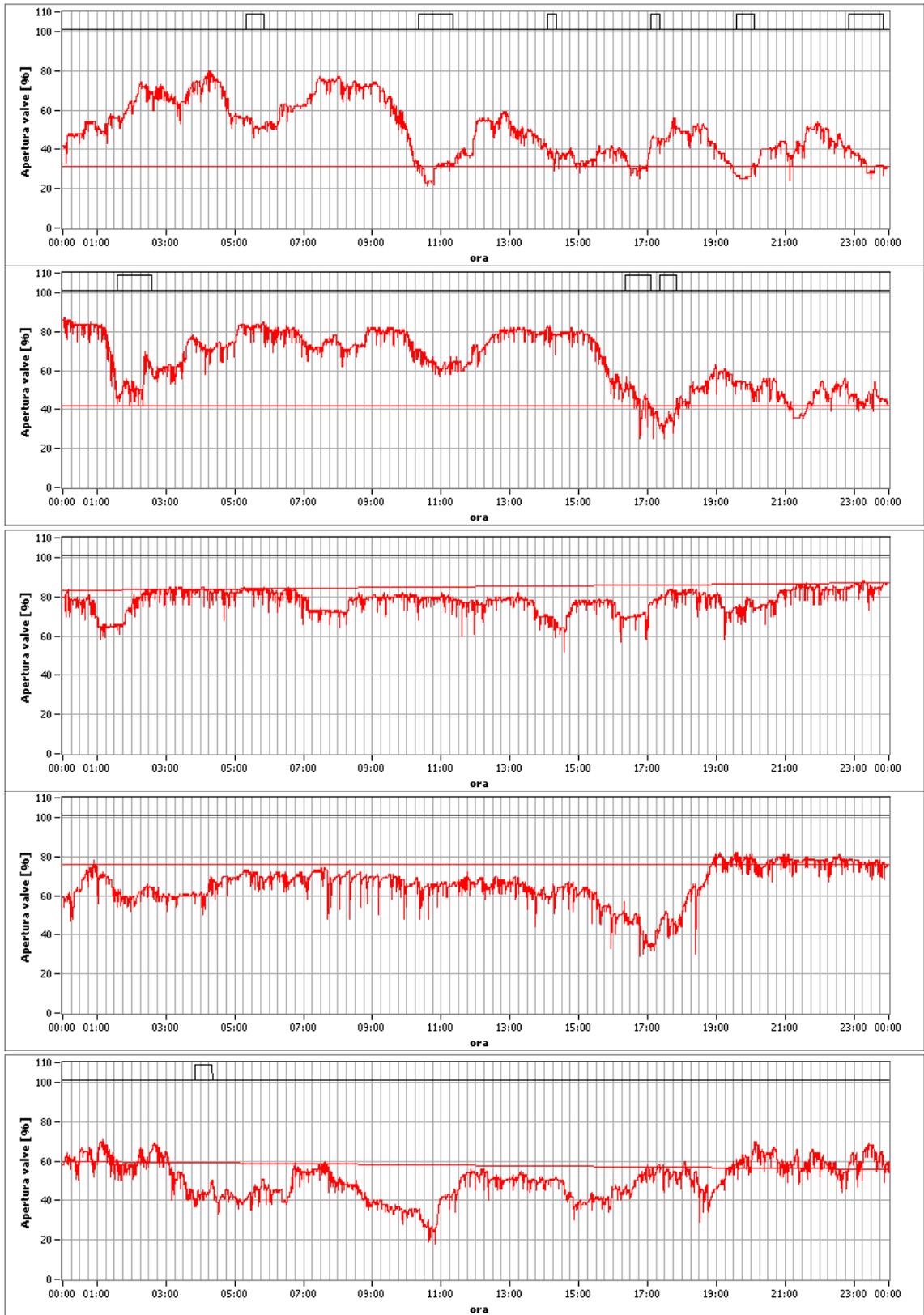
8.4.4. Esempi di report ottenuti con il monitoraggio biologico continuativo eseguito con il laboratorio mobile

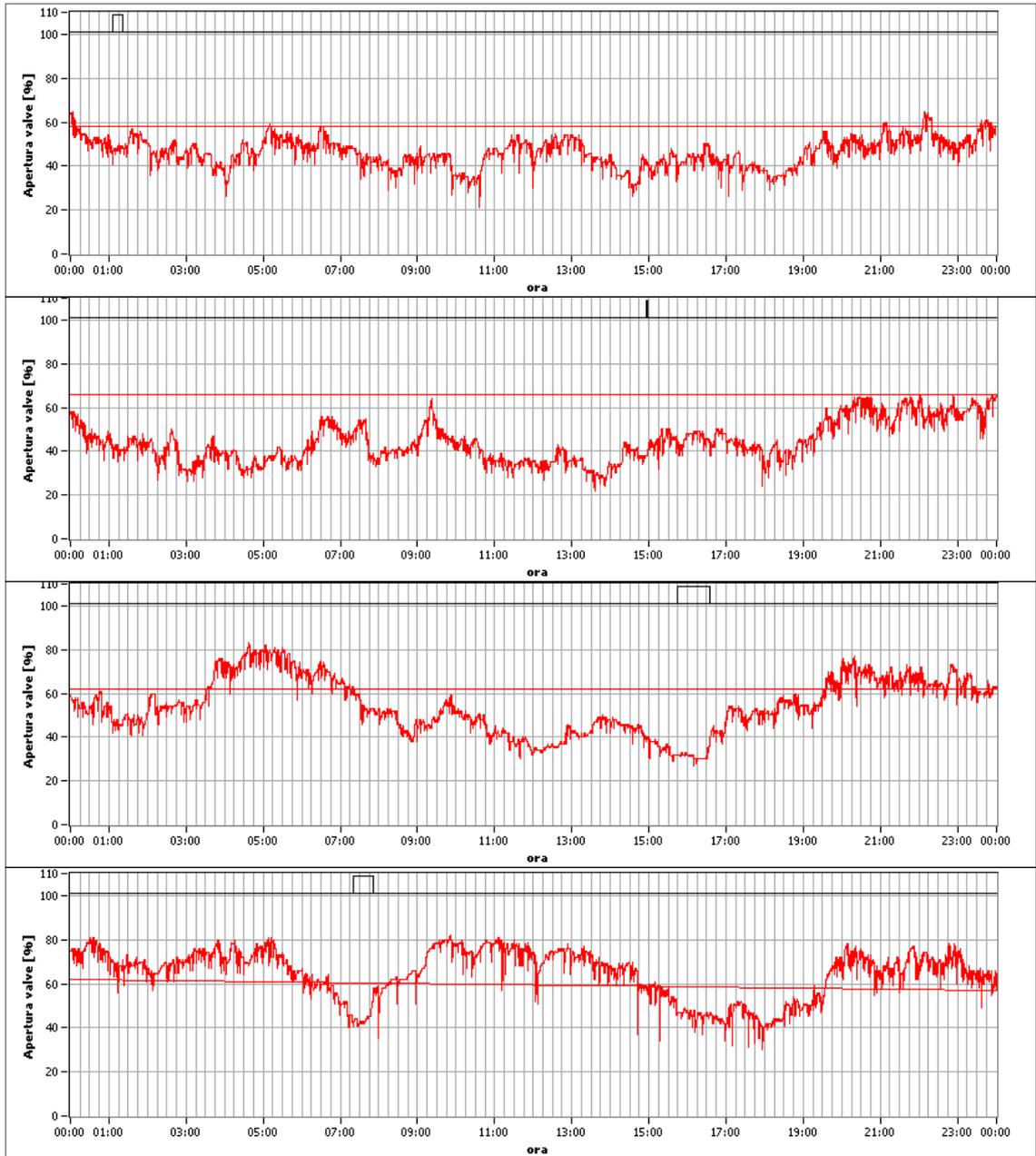
Moselmonitor Data - 01 settembre 2005







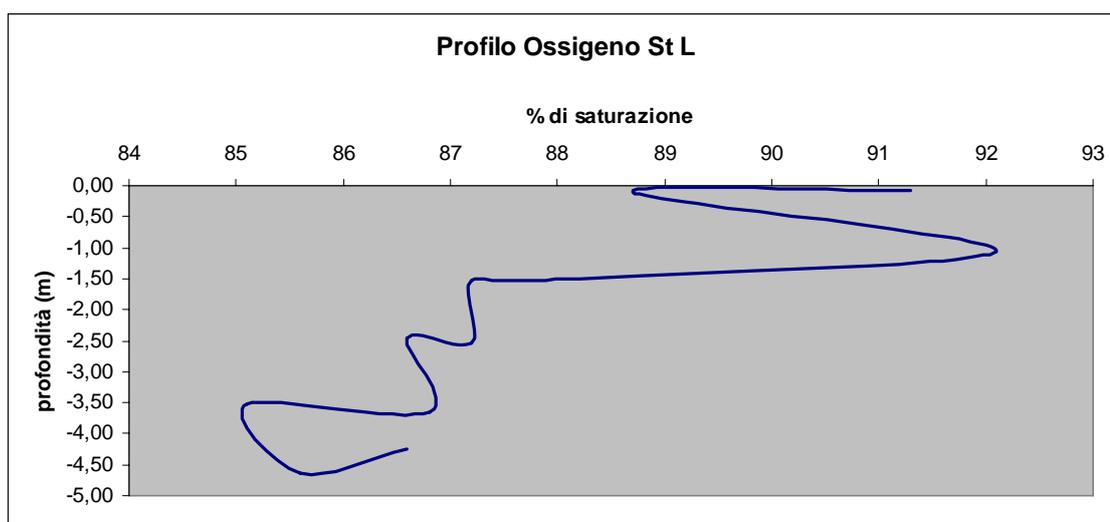
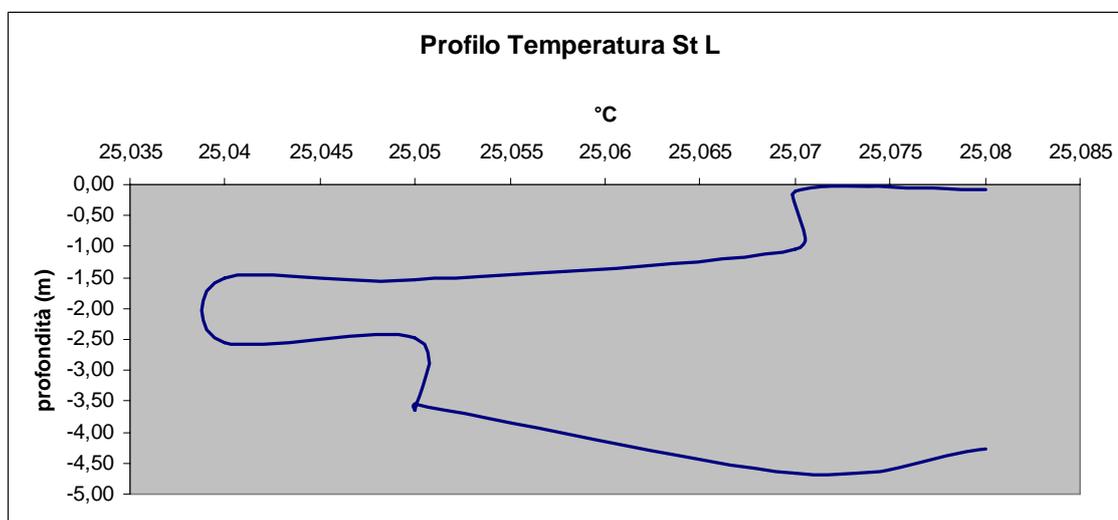


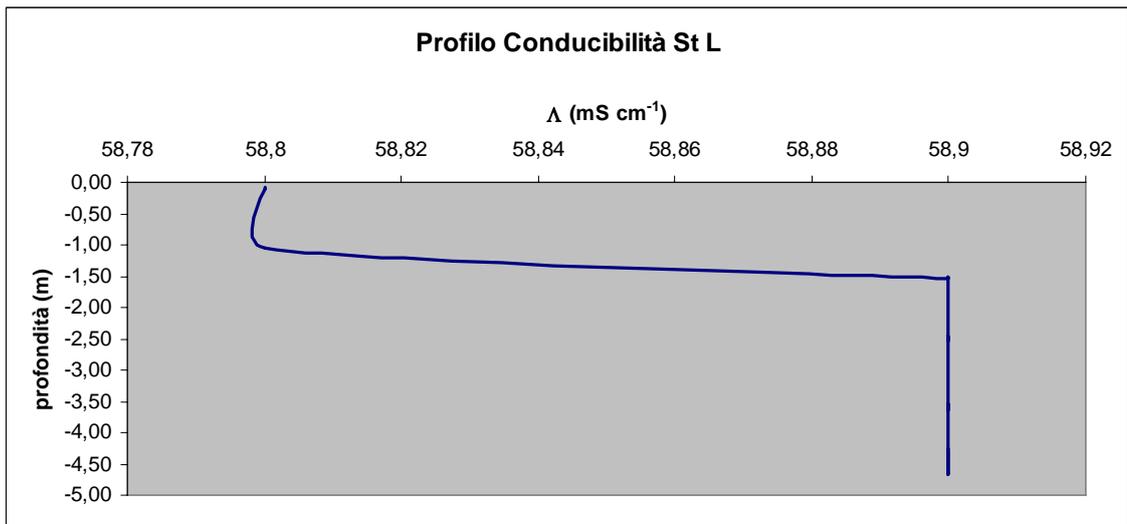
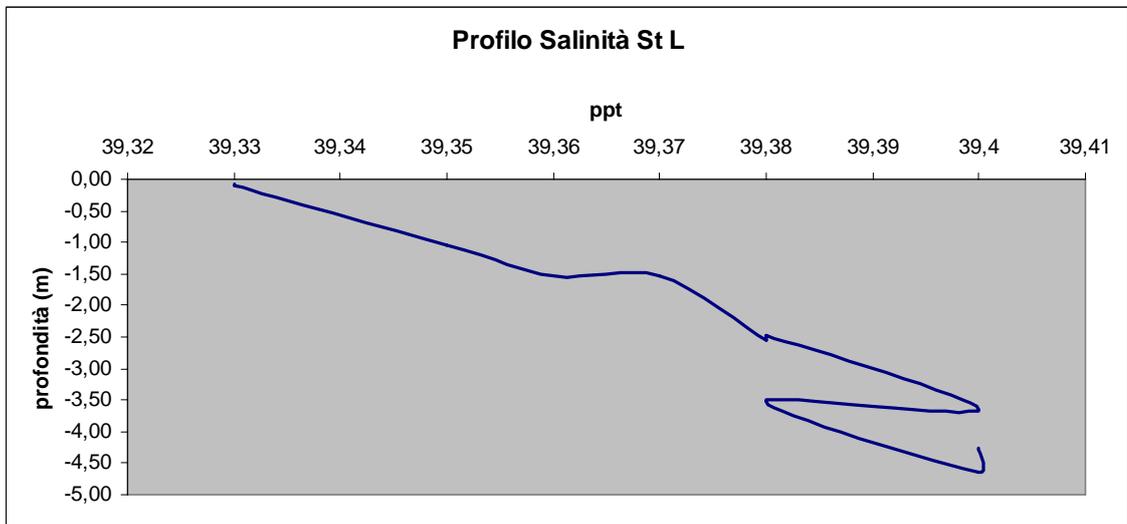
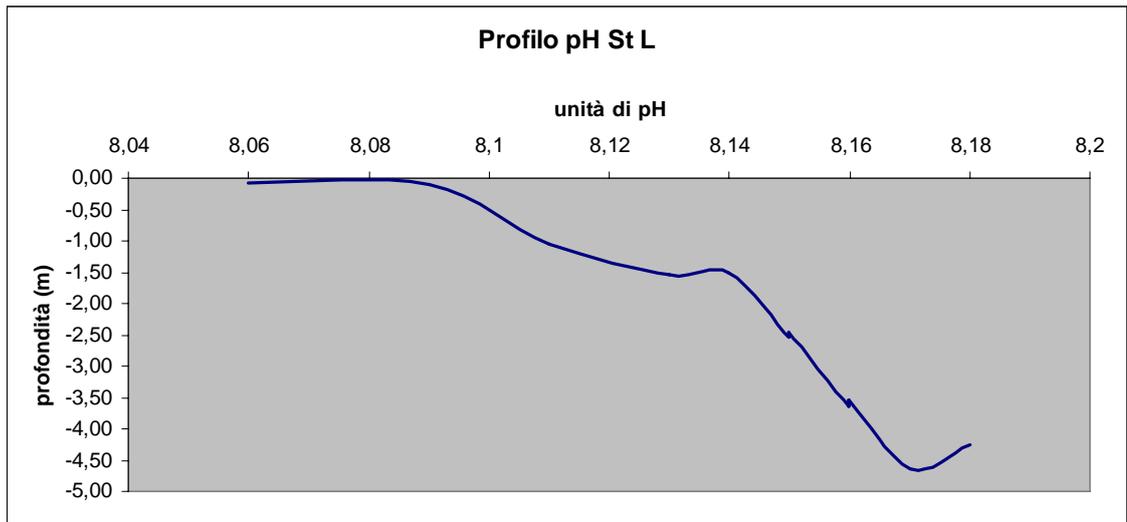


8.4.4.5. Esempi di report ottenuti con il monitoraggio chimico-fisico

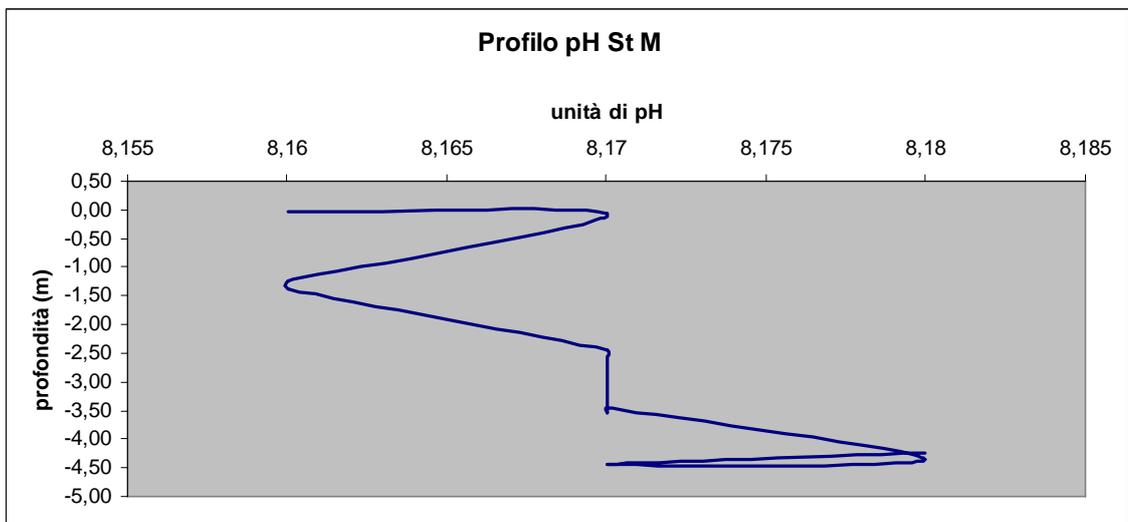
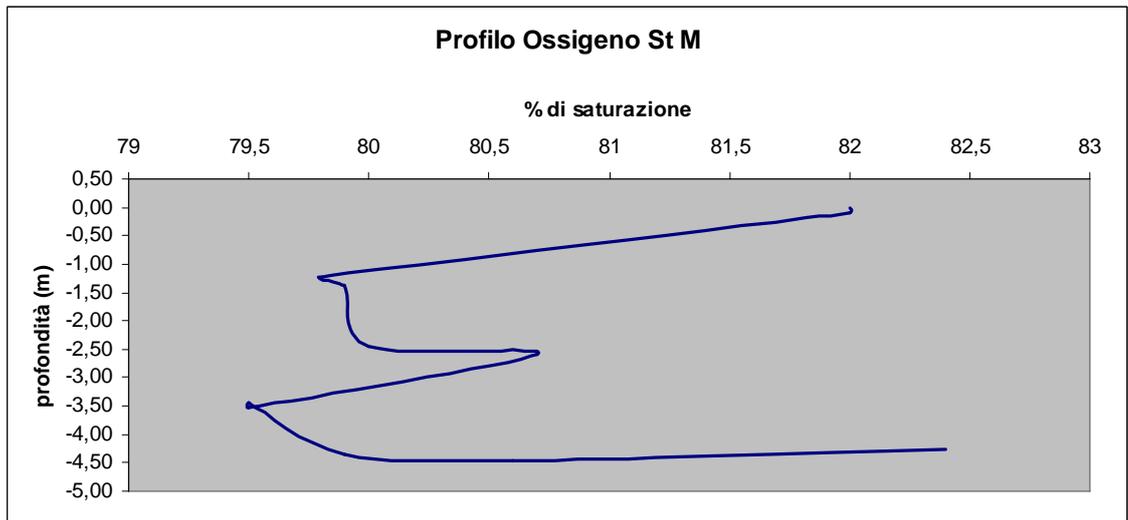
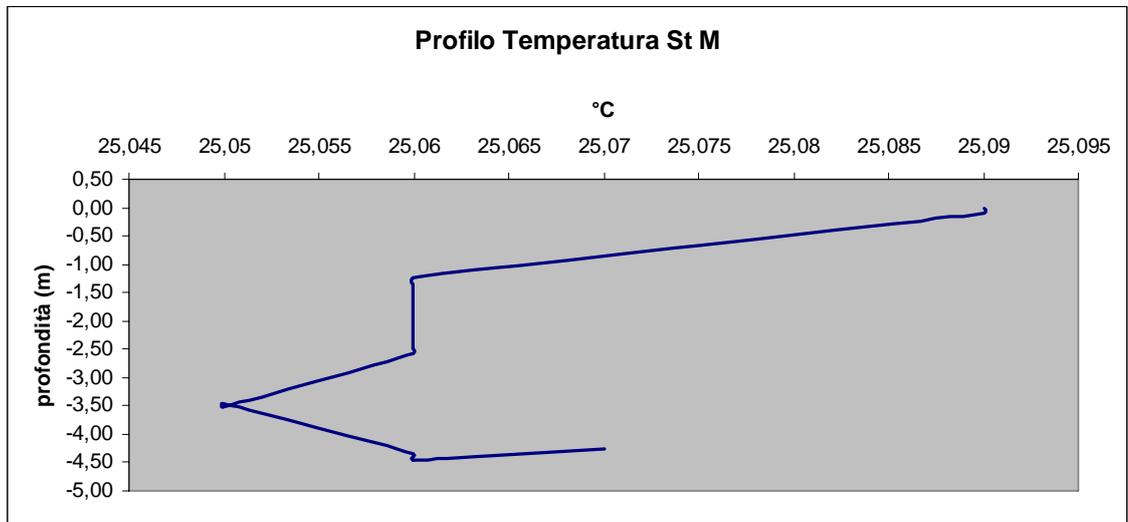
Di seguito vengono riportati grafici esemplificativi del monitoraggio chimico-fisico condotto presso le stazioni studiate del tratto di mare antistante lo stabilimento della Ex Eternit Siciliana di Siracusa S.p.A. condotti con CTD multiparametrico Hydrolab DataSonde 4°.

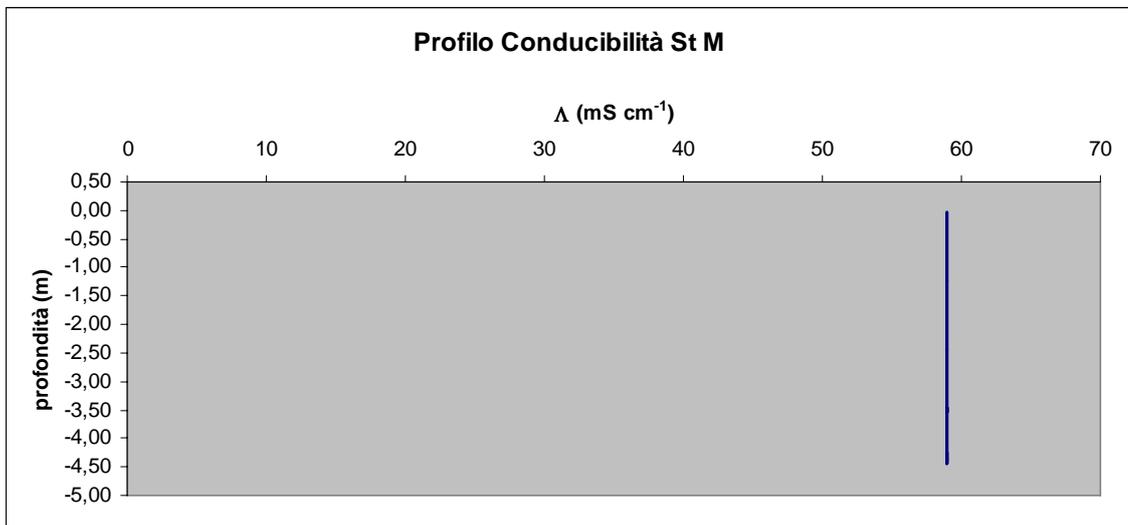
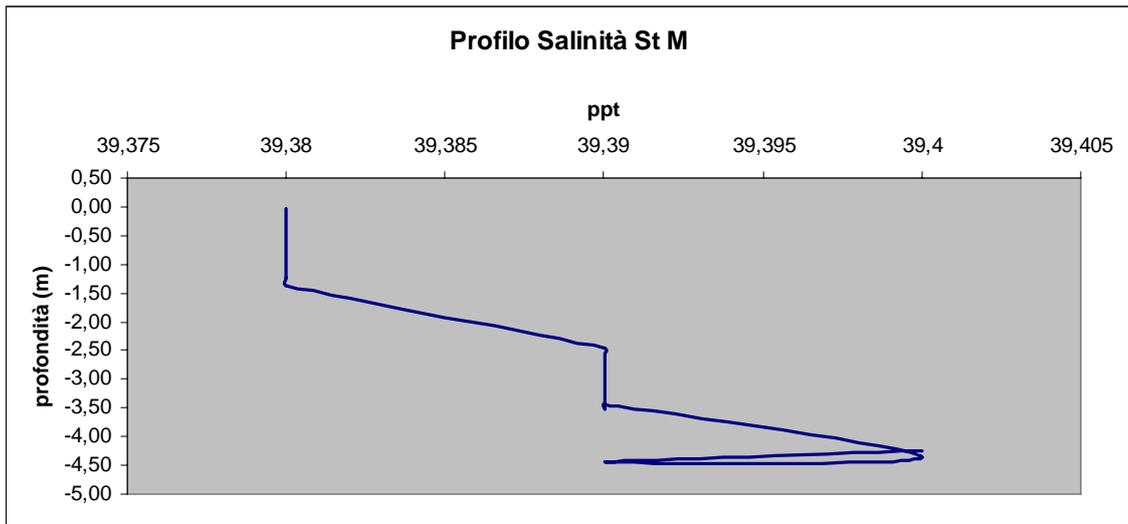
Stazione L Fase Pre



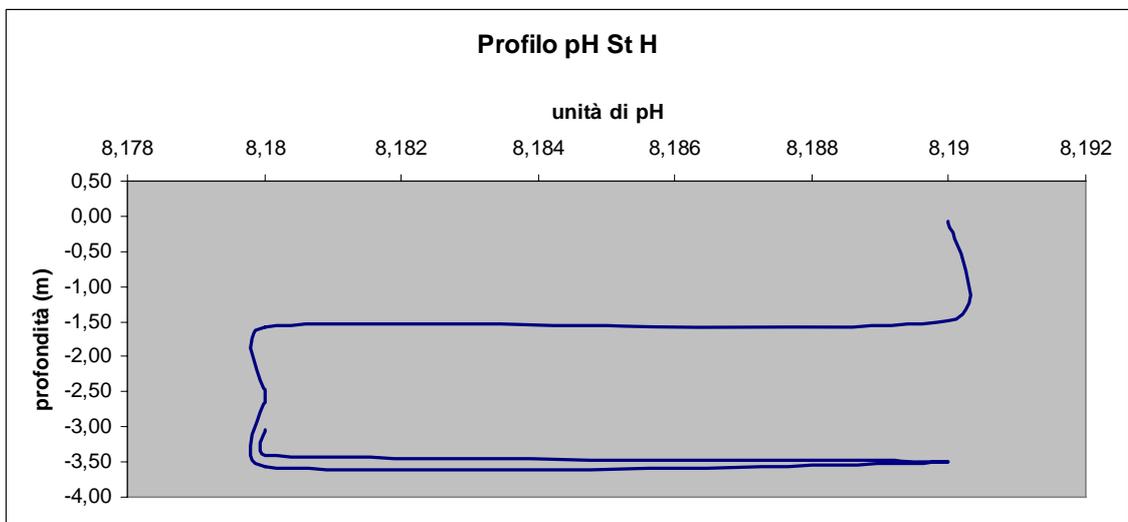
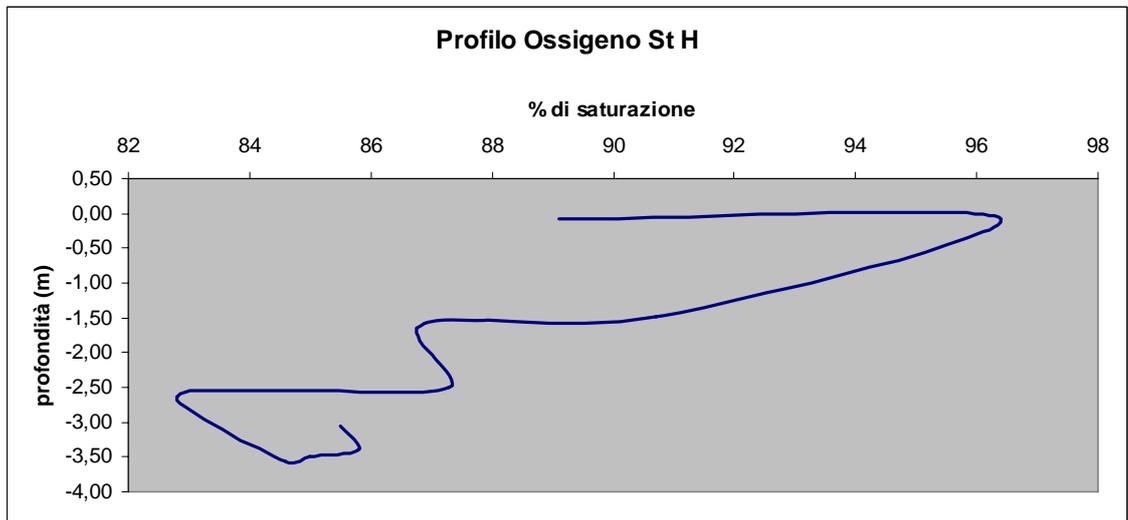
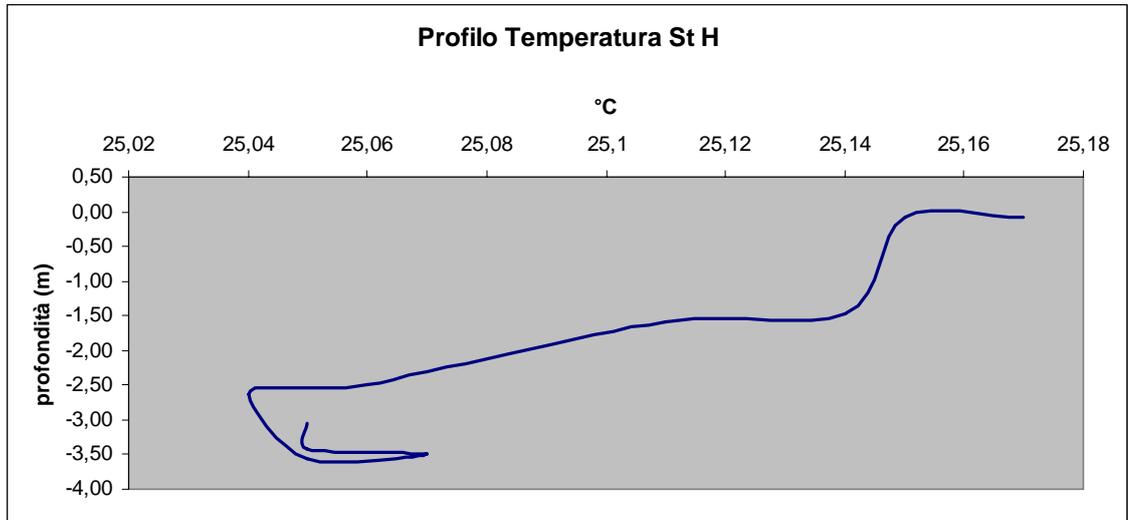


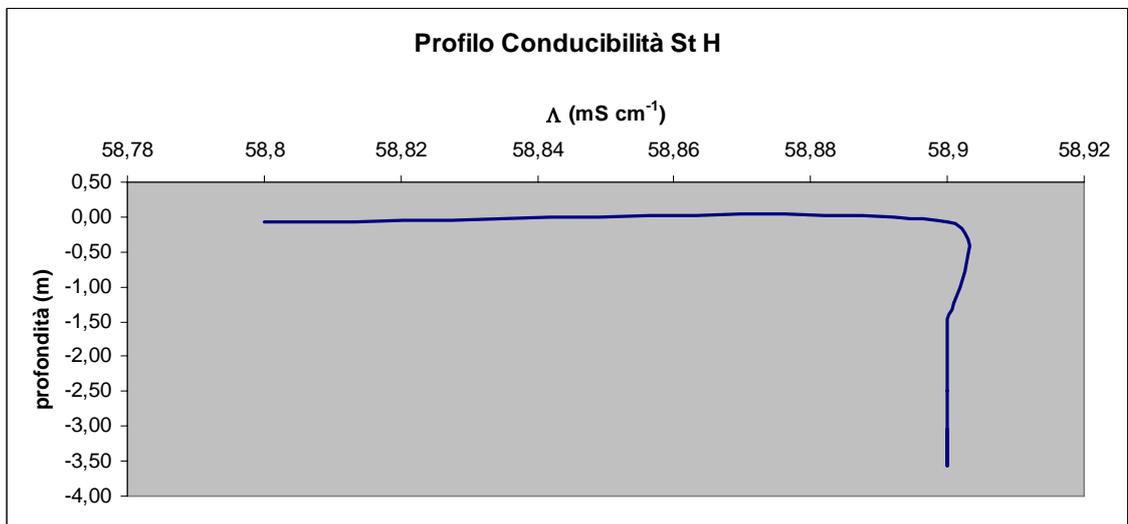
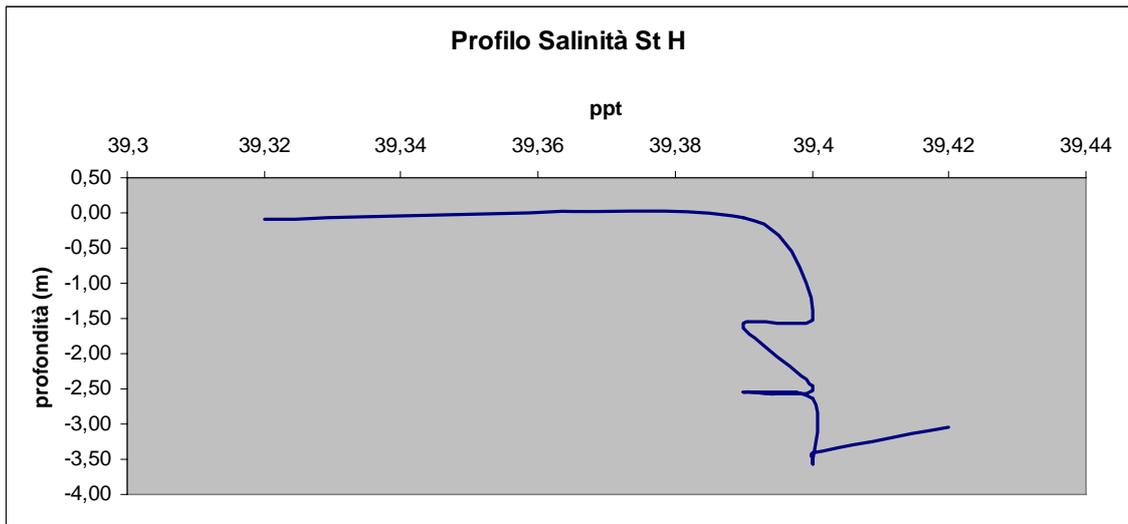
Stazione M Fase Pre





Stazione H Fase Pre





8.4.4.6. *La Validazione del PreAllarme*

Con validazione del preallarme si indica il processamento dei dati che porta a classificare come “fuori norma” o “anomalo” almeno uno dei parametri (sia chimico-fisici che biologici) acquisiti. L’elaborazione del segnale viene svolta in base ai seguenti punti:

- corrispondenza del valore rispetto al set di riferimento (tenuto conto della stagione, del sito di misura, dello strumento, dell’accuratezza della misura e di quanto può condizionarne l’interpretazione);
- diagnostica dello strumento/sensore che ha prodotto il dato sotto indagine ed eventuale attivazione di procedure
- confronto con i valori degli altri strumenti/sensori, affinché una correlazione fra più parametri possa eventualmente spiegare l’anomalia riscontrata (analisi multiparametrica);
- produzione del segnale di allarme qualora l’analisi multiparametrica porti all’attivazione del campionatore di acque.

A seconda del tipo di allarme prodotto (da biosensore A, C, D o G, oppure da sonda multiparametrica) è possibile gestire diversamente il campionatore in modo da disporre di un certo numero di campioni, di congrua entità ed adeguatamente prelevati nel tempo. Sarà così possibile disporre di informazioni sull’evolversi del fenomeno di criticità e si potrà caratterizzare anche il comportamento dei bivalvi installati nel biosensore.

A seconda dell’applicazione e delle capacità tecniche/tecnologiche dell’unità di lavoro, i campioni acquosi potranno essere sottoposti a diversi tipi di analisi di laboratorio; di particolare pregio risultano essere i test di tossicità (Brunelli, 2004) con esemplari allo stato larvale della specie installata sul biosensore.

VALUTAZIONE DEL PREALLARME



C8 Fig. 21 – Schema della valutazione del preallarme

8.5. Considerazioni finali

8.5.1. Monitoraggio con sonde BEWS

L'obiettivo sperimentale della messa a punto di un sistema di monitoraggio biologico è da considerare raggiunto sia per l'applicativo di laboratorio, ma in modo particolare, per l'applicativo in campo. Per quanto riguarda il biosensore, il lavoro svolto ha portato anche a definire alcuni miglioramenti da richiedere nel capitolato d'acquisto (specifica tecnica), che spingono a confrontare l'esemplare impiegato con altri in commercio o, eventualmente, a commissionare un nuovo strumento progettato su nostre indicazioni (Modugno, 2005).

E inoltre da ricordare che durante il monitoraggio biologico continuativo effettuato durante le fasi *pre*, *inter* e *post operam* di MISE, non sono mai stati registrati allarmi significativi. Tale risultato viene avvalorato anche dai dati derivanti dal controllo chimico fisico delle acque (i valori sono sempre risultati entro la norma) sia con il monitoraggio con CTD sia con il metodo analitico tradizionale.

Presso il Laboratorio Mobile, rimasto in dotazione al DAP di ARPA Siracusa dopo il termine del progetto qui descritto, è al momento funzionante un sistema complesso che fornisce ad un server i dati provenienti dalla sonda biologica-multiparametrica in campo e in laboratorio, a seconda della programmazione sperimentale.

Nei Prossimi mesi il prototipo testato sarà impiegato in diversi progetti tra i quali il più interessante è:

1. Realizzazione di un sistema di monitoraggio chimico-biologico finalizzato al controllo della qualità delle acque e implementazione del monitoraggio nella Rada di Augusta (progetto finanziato in fase di approvazione da parte della Direzione Generale di ARPA Sicilia)

8.5.2. Saggio di embriotossicologia in campo

Dai dati ottenuti in fase sperimentale, si può evincere che, *Mytilus galloprovincialis*, come organismo bersaglio impiegato nei saggi di embriotossicità, ha dimostrato essere quindi un buon bioindicatore. Per quanto riguarda le possibili ricadute applicative, la cozza potrebbe essere utilizzata, dunque, nel controllo ambientale della limitrofa Rada di Augusta nell'ambito di un sistema di allarme precoce, per l'analisi ecotossicologica di campioni di acque prelevati in seguito a segnali di preallarme, come quelli forniti ad esempio da un Mosselmonitor® (Brunelli *et al.*, 2004; Modugno *et al.*, 2005). In particolare, i saggi su embrioni consentono di confermare la presenza di eventuali sostanze tossiche e di valutarne l'impatto tossicologico, permettendo tempestivamente di approfondire le indagini analitiche, di ricercare e, possibilmente, rimuovere le cause della tossicità. Attualmente i test con molluschi bivalvi sono usati in Francia per valutare la qualità delle acque marino costiere della Baia di Arcachon (His *et al.*, 1997; Geffard *et al.*, 2001) e in Italia per valutare la tossicità di alcuni composti di interesse ambientale, come i pesticidi e il rame (Losso *et al.*, 2004), ma la prospettiva futura è che entrino a far parte delle analisi di routine per la valutazione della qualità delle acque degli ambienti marini costieri in generale, ma soprattutto di quelle zone in cui sono presenti colture o banchi naturali di bivalvi.

In conclusione, si può affermare che le finalità proposte in questo lavoro sono state raggiunte, alla luce di quanto esposto si propone quindi tale metodo come strumento di monitoraggio per gli ambienti marino costieri soggetti a MISE o bonifica.

8.5.3. Saggio ittiotossicologico in campo

Il lavoro evidenzia alcuni aspetti interessanti nell'indicare il branzino e l'orata come specie funzionali all'impiego in saggi per la valutazione ittiotossicologica della qualità delle matrici acqua e sedimento marini e dell'eventuale bioaccumulo di metalli pesanti, come auspicato dalle normative nazionali (DLgs. 152/06) e sopranazionali (WFD 2000). I protocolli fino ad ora impiegati e standardizzati in ittiotossicologia prevedono test a flusso continuo e semistatici per la determinazione della ecotossicità e del bioaccumulo in laboratorio. Dai risultati emersi in questo studio si può affermare che un saggio in campo, sia applicabile per test di routine, perché facilmente ripetibile, di veloce applicazione e sicuramente vantaggioso dal punto di vista delle spese per il monitoraggio in ambienti così particolari.

Inoltre appare abbastanza evidente come le specie ittiche utilizzate possano essere impiegate per saggi condotti in campo (Melotti et al. 2003) sia con gabbie galleggianti sia, come nel caso delle operazioni di MISE eseguite a Priolo. Si propone infatti, come protocollo applicativo, una metodologia a 28 giorni per la determinazione della ecotossicità e del possibile bioaccumulo in campo.

Si auspica, per sperimentazioni future, di riuscire a caratterizzare eventuali curve di assunzione e depurazione, anche per metalli pesanti, in modo da poter verificare e confrontare quanto appena descritto. Per indagare, inoltre, la bontà del dato fisiologico anche alle basse concentrazioni, si potrebbero prendere in considerazione *end point* genotossici (su sangue periferico) e *biomarkers* per comprendere il possibile effetto tossicologico del metallo.

8.6. Bibliografia

8.6.1. Monitoraggio con sonde BEWS

Baldwin I.G., Kramer K.J.M. (1994) - Biological Early Warning Systems (BEWS). Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. CRC Press Inc..

BRUNELLI F., GELLI F., PREGNOLATO L., PUMO T.C., SCIALOJA M.G., BENCIVELLI S., SELVATICO L., RONCARATI A., SAVORELLI F., 2004. Rilevazione delle emergenze idriche con sensori di preallarme e valutazione dei sedimenti e delle acque destinate alla molluschicoltura attraverso test ecotossicologici (*Mytilus galloprovincialis*). *Biologia Marina Mediterranea*, **11** (2): 490-492.

EPA. (2001) – Real-Time monitoring for toxicity caused by harmful algal blooms and other water quality perturbations. EPA/600/R-01/103, November 2001.

EPA. (2002) - Developing and implementing an estuarine water quality monitoring, assessment, and outreach program. The MYSound Project. EMPACT, Environmental Monitoring for Public Access % Community Tracking, EPA/625/R-02/010, November 2002.

Gelli F., Palazzi D., Brunelli F., Pregnotato L., Malaguti A., Tesini E., Biasini G., Melotti P. & Roncarati A. (2003) - Rilevamento in tempo reale delle situazioni di criticità in acque di transizione. Acquacoltura International 2003, Verona, 15-17 ottobre, poster.

Gelli F., Palazzi D., Pregnotato L., Venturini F., Savorelli F., Modugno S., Floris B., Roncarati A., Conti D. (2004) - Sostanze prioritarie: i pesci (*Dicentrarchus labrax*, *Cyprinus carpio*) quali organismi bersaglio in test ecotossicologici, di bioconcentrazione e in saggi finalizzati a valutazioni di genotossicità. Convegno conclusivo del Progetto Nazionale di Monitoraggio delle Acque, Firenze 26-27 aprile 2005. Progetto Nazionale Monitoraggio delle Acque (Spaggiari R., ARPA-ER).

ILSI (International Life Science Institute) (1999) - Early Warning Monitoring To Detect Hazardous Events In Water Supplies, ILSI.

Jenner H.A., Noppert F. & Sikking T. (1989) - A new system for the detection of valve-movement response of bivalve. *Kema Scientific & Technical Reports*, **7**(2): 91-98.

Kasthuri J., Chandran M. R. (1997) – Sublethal effects of lead on feeding energetics, growth performance, biochemical composition and bioaccumulation of the estuarine catfish, *Mystus gulio* (Hamilton). *Journal for Environmental Biology*, **18**(1): 95-101.

- Kosmala A., Charvet S., Roger M. C., Faessel B. (1999) – Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Research*, **33**(1): 266-278.
- Kramer Kees J.M. & Botterweg J. (1991) - Aquatic Biological Early Warning Systems: An Overview. Bioindicator and Environmental Management ISBN 0-12-382530-3. 95-126.
- Modugno S., Savorelli F., Palazzi D., Fano E.A. (2005)- Valutazione dell'effetto di tossici di riferimento su due batterie di test ecotossicologici d'acqua dolce e salata. Atti XV° Congresso S.It.E., Torino, 12-14 settembre 2005: Ambiente, Risorse e Sviluppo.
- Modugno S., Scarpato A., Gelli F. & Brunelli F. (2005) - *Mytilus galloprovincialis* quale organismo bersaglio impiegato nella messa a punto di sistemi di preallarme biologico (BEWS) e di test ecotossicologici nel monitoraggio in continuo delle acque. Atti IV° Congresso Internazionale delle Società Malacologiche Europee, Napoli, 10-14 ottobre 2005.
- Nimmo D. R., Willox M-J., Lanfrancois T.D., Chapman P.L., Brinkman S.F., Greene J.C. (1998) – Effects of metal mining and milling boundary waters of Yellowstone National Park, USA. *Environmental Management*, **22**(6): 913-926.
- US-EPA (1993) – Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, Fourth Edition: 293 pp.

8.6.2. Saggio di embriotossicologia

ASTM, 1998. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. E 724-98, American Society for testing and materials, Philadelphia, PA, USA, 21 pp.

CENTENO M.D., BRENDON L., PERSOONE G. (1993) – Cyst-based Toxicity Tests. III Development and Standardization of an Acute Toxicity Test with the Freshwater Anostracan Crustacean *Streptocephalus Proboscideus*. In: Soares A.M.V.M., Calow P. (eds), Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests, Lewis Publishers, SETAC Special Publications Series: 37-55.

GEFFARD OLIVIER, HIS EDOUARD, BUDZINSKI HELENE, SEAMAN MATTHIAS, GARRIGUES PHILIPPE (2001) – Qualité biologique de l'eau de mer évaluée in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *Life Sciences*, **324**: 1149-1155.

HIS E., SEAMAN M.N.L. & BEIRAS R. (1997) – A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, **31**(2): 351-355.

LOSSO C., HIS E., GHETTI P.F. & VOLPI GHIRARDINI A. (2004) – Sensitivity of embryotoxicity test with *Mytilus galloprovincialis* (LMK) towards some compounds of environmental interest (copper and pesticides). *Environmental Technology*, **25**: 841-846.

MORSE D.E., DUNCAN H., HOOKER N. & MORSE A. (1977) – Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*, **196**: 298-300.

TUROLLA E., SAVORELLI F., PALAZZI D., GELLI F. (2006) – Impiego di tecniche di induzione all'emissione dei gameti in *Crassostrea gigas* per l'esecuzione di test di embriotossicità. Bollettino Malacologico.

TUROLLA E., CASTALDELLI G., BARBIN L. & ROSSI R. (2002a) – Induzione all'emissione dei gameti in *Mytilus galloprovincialis* mediante l'impiego di due stimolanti chimici (KCl e H₂O₂). *Biologia Marina Mediterranea*, **10**(2): 490-491.

TUROLLA E., CASTALDELLI G., BARBIN L. & ROSSI R. (2002b) – Manuale guida alla riproduzione controllata di *Modiolus barbatus*. Technical Report. Dip. Biologia – Univ. Ferrara, 31 pp.

US EPA (1995) – Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and mussel, *Mytilus* sp. embryo-larval developmental test method. In: EPA/600/R-95/136, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. 13. Cincinnati, Ohio, USA, : 209-258.

VIGHI M., BACCI E. (1998) – Ecotossicologia. UTET, Torino, pag. 3-7, 23-39.

VOLPI GHIRARDINI A., GHETTI P.F., GIMONA A., PANTANI C., ARIZZI NOVELLI A.,
MAFFIOTTI A. & BONA F. (1995) – Rilevazione del rischio tossico di sedimenti lagunari.
Società Italiana Ecologia Atti, **16**: 719-721.

VOLPI GHIRARDINI A., PELLEGRINI D. (2001) – I saggi di tossicità nella valutazione della qualità di
acque e sedimenti di ambienti marini e di transizione: indicazioni per la scelta, la messa a punto, la
valutazione e l'utilizzo dei metodi. *Biol. Mar. Medit.*, **8**(2): 1-16.

8.6.3. Monitoraggio con pesci sentinella

- DE LUISE G. (1998) – Ittiologia speciale. Pesci, pesca & ambiente d'acqua dolce. Litoimmagine editore, Udine, **4**: 9-253.
- ESSINK K. (1989) – Chemical monitoring in Dutch Wadden Sea by means of benthic invertebrates and fish. *Helgoländer Meeresunters*, **43**: 435-446.
- GHITTINO P. (1983) – Tecnologia e Patologia in Acquacoltura. Vol.1- Tecnologia. Tipografia Emilio Bono, Torino, 532 pp.
- HORUNG H. & N. Kress (1991) – Trace elements in offshore and inshore fish from the Mediterranean coast of Israel. *Toxicol. Environ. Chem.*, **31-32**: 135-145.
- IRSA-CNR (1994) – Metodi analitici per le acque. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 342 pp.
- JOHNSON D.W. & I. Katavic (1984) – Mortality, growth and swim bladder stress syndrome of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae under varied environmental conditions. *Aquaculture*, **38**: 67-78.
- JOHNSON R. K. (1998) – Spatiotemporal variability of temperate lake macro-invertebrate communities: detections of impact. *Ecological Applications*, **8**(1): 61-70.
- KASTHURI J., CHANDRAN M. R. (1997) – Sublethal effects of lead on feeding energetics, growth performance, biochemical composition and bioaccumulation of the estuarine catfish, *Mystus gulio* (Hamilton). *Journal for Environmental Biology*, **18**(1): 95-101.
- KOSMALA A., CHARVET S., ROGER M. C., FAESSEL B. (1999) – Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Research*, **33**(1): 266-278.
- MELOTTI P., AMERIO M., GENNARI L., RONCARATI A. (1992) – Valutazioni comparative sull'impiego di alcune diete inerti nello svezzamento del branzino (*Dicentrarchus labrax* L.). *Zool. Nutr. Anim.* **3-4**: 191-200.
- MODUGNO S., F. Gelli & E.A. Fano (2005a) – Messa a punto di un test semistatico cronico per la valutazione delle cinetiche di bioaccumulo di metalli pesanti (Cd e Hg) con *Dicentrarchus labrax*. Atti XV° Congresso Nazionale S.It.E., Torino, 12-14 settembre 2005: Ambiente, Risorse e Sviluppo.

- MODUGNO S., F. Savorelli, D. Palazzi & E.A. Fano (2005b) – Valutazione dell'effetto di tossici di riferimento su due batterie di test ecotossicologici d'acqua dolce e salata. Atti XV° Congresso Nazionale S.It.E. , Torino, 12-14 settembre 2005: Ambiente, Risorse e Sviluppo.
- MODUGNO S., D. Palazzi, F. Gelli & E.A. Fano (2005c) – Valutazione comportamentale attraverso video-monitoraggio con VFB (Visio Fish Behaviour) di due specie ittiche endemiche in esposizione a tossici di riferimento (Terbutilazina, Propanil). Atti XV° Congresso Nazionale S.It.E., Torino, 12-14 settembre 2005: Ambiente, Risorse e Sviluppo.
- MODUGNO S. & E.A. Fano (2005d) – Saggio semistatico di bioaccumulo per il biomonitoraggio di elementi in tracce (metalli pesanti, Cd) mediante *Dicentrarchus labrax*. Atti AIOL, 2° Incontro dei Dottorandi in Scienze dei Sistemi Acquatici, Bertinoro, 7-9 novembre 2005.
- MODUGNO S., F. Gelli & P. Trentini (2005e) - Acque di transizione – DLgs 152/99: Attività di ricerca del Laboratorio Ittiologico come esperienza del Dipartimento Tecnico di ARPA Emilia Romagna Sezione Provinciale di Ferrara. Atti del Seminario - Acque di transizione:analisi, descrittori, prospettive future. Cesenatico, 22-24 novembre 2005, Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna, Struttura Oceanografica Daphne.
- MODUGNO S., F. Venturini, F. Gelli, P.L. Trentini & E.A. Fano (2006a) – Saggio semistatico cronico a 28 giorni per la valutazione della bioconcentrazione di cadmio in organi bersaglio di esemplari di *Dicentrarchus labrax*, in funzione della taglia e della età. Atti XVI° Congresso Nazionale S.It.E., Viterbo - Civitavecchia, 19-22 settembre 2006: Cambiamenti Globali , Diversità Ecologica e Sostenibilità.
- NIMMO D. R., WILLOX M-J., LANFRANCOIS T.D., CHAPMAN P.L., BRINKMAN S. F., GREENE J. C. (1998) – Effects of metal mining and milling boundary waters of Yellowstone National Park, USA. *Environmental Management*, **22**(6): 913-926.
- OTWAY N.M. (1992) – Bioaccumulation studies on fish: choice of species, sampling designs, problems and implications for environmental management. In: Proceedings of Bioaccumulation Workshop: Assessment of distribution, impacts and bioaccumulation of contaminants in aquatic environments. Water Board Australian Science Association Incorporation, Sydney, 103-113.
- PALAZZI D., GELLI F., NOVI C., PENAZZI L., PREGNOLATO L., TRENTINI P. L., CORAZZARI M., SAVORELLI F., RONCARATI A., MELOTTI P., MANTOVANI E., FINCO R. (2001) – Messa a punto di metodi ecotossicologici, come auspicato dal Decreto Legislativo 152/99: uso di specie ittiche endemiche (*Alburnus alburnus*) e verifica di questo indicatore per la classificazione e valutazione delle acque interne della provincia di Ferrara. In: Atti Conv. “Conservazione e sviluppo sostenibile nel Parco del Delta del Po”, Comacchio (Fe), 9 febbraio 2001.

- POCKLINGTON P. & P. G. Wells (1992) – Polychaetes. Key taxa for marine environmental quality monitoring. *Mar. Pollut. Bull.*, **24**:593-598.
- POULIN R. (1992) – Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. *Parasitology Today*, **8**(2): 58-61.
- RAINBOW P.S. & D.J.H. Phillips (1993) – Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.*, **26**: 593-601.
- SHARIF A.K.M., A.I. Mustafa, A.H. Mi rza & S. Safiullah (1991) – Trace metals in tropical marine fish from the Bay of Bengal. *Sci. Total Environ.*, **107**: 135-142.
- TORTONESE E. (1975) – Fauna d'Italia. Osteichthyes. Edizioni Calderini, Bologna, X+540 pp (parte prima) e XVIII+636 pp (parte seconda).
- TURGEON D.D. & T.P. O'Connor (1991) – Long Island Sound: Distributions, trends and effects of chemical contamination. *Estuaries*, **1**: 309-320.
- UNICHIM (1999) – Linee guida per la classificazione biologica delle acque correnti superficiali. Manuale n.191, 59 pp.
- US-EPA (1993) – Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, Fourth Edition, 293 pp.
- VIGANÒ L. (1998) – Metodo per saggio di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Notiziario dei metodi analitici IRSA-CNR: 19-27.
- VUKADIN I., P. Stegnar & B. Smodis (1982) – Fate and distribution of toxic heavy metals in sediments and organisms of the Kastela Bay. *Acta Adriat.*, **23**: 307-312.

9. SINTESI DEI RISULTATI GENERALI

Di seguito viene presentata una lista sintetica dei risultati generali ottenuti dall'esecuzione del presente progetto:

- 1. valutazione dello stato ecologico delle comunità macro e meio bentoniche:**
tale valutazione si è ottenuta grazie al confronto di lavori di ricerca effettuati, nei siti inquinati con un sito di controllo, rispettivamente prima dell'esecuzione dei lavori di MISE e dopo la loro conclusione; il confronto tra la struttura di comunità riscontrata nella fase *pre* e nella fase *post* ha evidenziato marcate differenze; i lavori per la MISE del sito hanno completamente modificato la struttura di comunità macrobentonica nel sito di Priolo, al punto che la comunità *pre*-bonifica è risultata più simile al controllo che alla comunità *post*-bonifica; i popolamenti bentonici di fondo mobile costituiscono, nel loro insieme, una componente estremamente sensibile alle variazioni ambientali, spesso considerevolmente più efficace nel rilevare gli impatti rispetto alle misurazioni dei classici parametri fisico-chimici; la caratterizzazione delle comunità naturali tipiche di un'area di indagine è essenziale, non solo a fini conservazionistici, ma anche ad un livello più strettamente applicativo, come questo studio ha dimostrato; il proseguimento di programmi di monitoraggio incentrati sui processi di ricolonizzazione dell'area a mare prospiciente l'ex Stabilimento Eternit di Siracusa fornirebbe un valido ed insostituibile strumento per la corretta gestione di zone costiere particolarmente sensibili quali quelle studiate.
- 2. valutazione bionomica subacquea (videofotografica) del livello di colonizzazione presente** del tratto di mare prospiciente lo stabilimento della Ex Eternit Siciliana S.p.A. di Siracusa impattato da sversamento di manufatti in cemento amianto; tale valutazione si è ottenuta grazie al confronto di lavori di ricerca effettuati, nei siti inquinati con un sito di controllo, rispettivamente prima dell'esecuzione dei lavori di MISE e dopo la loro conclusione.; il confronto tra la struttura di comunità del popolamento riscontrata nella fase *pre* e nella fase *post* ha evidenziato marcate differenze; l'esecuzione di transetti batimetrici, geomorfologici e bionomici eseguiti nella fase *ante operam* ha permesso di individuare differenze per quanto riguarda il grado di biodiversità presente sui

fondali studiati, infatti le superfici di cemento amianto sono risultate meno colonizzate o colonizzate a livelli di successione primaria, se confrontate con l'ambiente circostante; i lavori per la MISE del sito hanno completamente modificato la struttura di comunità del ricoprimento bentonico nel sito di Priolo, al punto che la comunità *pre*-bonifica è risultata più simile al controllo che alla comunità *post*-bonifica; la fotointerpretazione e il transetto bionomico si sono rivelati strumenti idonei per il monitoraggio di zone di mare sottoposte a controllo, in quanto sono in grado di fornire dati ed informazioni utili agli organi competenti e di produrre banche dati confrontabili e consultabili nel tempo.

3. **biomonitoraggio** inteso come nuovo strumento in grado di approcciare la tematica del controllo ambientale utilizzando sia strumentazione innovativa sia metodologia analitica comprovata ha prodotto la messa a punto di metodologie ecotossicologia in campo che potrebbero aprire nuove possibilità di intervento e controllo da parte degli organi competenti (ARPA), in particolare in ambienti soggetti a MISE o bonifica.

10. CONCLUSIONI FINALI

A seguito dei lavori di Messa in Sicurezza d'Emergenza (MISE) del sito della ex Eternit Siciliana S.p.A. di Siracusa (località Contrada Targia, Priolo - SR), il tratto di mare antistante lo stabilimento ha subito un azzeramento biologico provocato dalla necessaria asportazione meccanica di parte del fondale. I lavori di MISE, infatti, sono stati effettuati sulla base di un progetto di risanamento voluto dal Ministero dell'Ambiente per rimuovere gli accumuli di manufatti in cemento amianto, depositati durante gli anni di attività della ditta nel tratto di mare prospiciente. Parallelamente alle operazioni di MISE è stato condotto uno studio di ricerca denominato progetto VEGAM per la valutazione eco-biologica, ecotossicologica e di monitoraggio ambientale nelle situazioni prima, durante e a seguito delle attività di risanamento. Tale progetto, pensato ed eseguito dalle ARPA Emilia Romagna e Sicilia insieme all'Università degli Studi di Ferrara, ha portato non solo ad una analisi della risposta biologica rispetto all'inquinamento da amianto presente, ma ha anche aperto spiragli innovativi in materia di biomonitoraggio di siti impattati attraverso valutazioni dell'evoluzione ecologica, supportate da analisi di approccio ecotossicologico. In conclusione i lavori eseguiti hanno portato il tratto di mare ad essere assimilabile ad un ambiente immaturo e soggetto alle prime fasi di colonizzazione animale e vegetale. Praticamente un terreno vergine adatto per uno studio interdisciplinare che possa indagare l'ecologia della fascia costiera nelle prime fasi di sviluppo e che possa contemporaneamente servire da indicatore nella valutazione dell'impatto antropico ed industriale così presente in un territorio come la costa tra Catania e Siracusa.